

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[•]

Université de Sherbrooke

**Identification des sites de phosphorylation basale et dépendante de la PKC sur
TRPC6.**

Par
SIMON BOUSQUET
Département de Pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
En vue de l'obtention du grade de
philosophiae doctor (Ph.D.) en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Janvier 2011

Membres du jury de thèse :

Guylain Boulay, directeur de thèse, département de pharmacologie.

Jean-Bernard Denault, directeur des programmes gradués de pharmacologie.

Xavier Roucou, évaluateur externe aux programmes, département de biochimie.

Robert Moreau, évaluateur externe à l'université, Université du Québec à Montréal.

© Simon Bousquet, 2011



**Library and Archives
Canada**

**Published Heritage
Branch**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque et
Archives Canada**

**Direction du
Patrimoine de l'édition**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-83341-4

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-83341-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Identification des sites de phosphorylation basale et dépendante de la PKC sur TRPC6.

Par

SIMON BOUSQUET

Département de pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

Le Ca^{2+} intracellulaire est impliqué dans une foule de processus biologiques chez toutes les cellules de l'organisme. Chez les cellules non-excitables, les protéines TRPC situées à la membrane plasmique sont des canaux calciques impliqués dans l'entrée de calcium. TRPC6 est particulièrement étudié vu son implication potentielle dans plusieurs pathologies, dont la FSGS, l'IPAH et certains cancers. Ses modes et mécanismes d'activation et de régulation sont encore aujourd'hui méconnus, malgré les recherches intenses menées. Le but de la présente étude est d'investiguer la régulation de TRPC6 via sa phosphorylation. En ce sens, nous avons utilisé des techniques de marquage métabolique et de vidéomicroscopie afin d'évaluer la phosphorylation directe de TRPC6 ainsi que son activité. Nous avons ainsi identifié une phosphorylation basale de TRPC6 ainsi qu'une phosphorylation dépendante de la PKC.

La PKC a été démontrée pour moduler l'activité de TRPC1, TRPC3, TRPC4 et TRPC5. De récentes études ont aussi montré que TRPC6 semble être inhibé par la PKC. Notre première étude confirme que l'activation de la PKC mène à une inhibition de l'activité de TRPC6. L'utilisation du GF1, un inhibiteur spécifique des PKC, induit une potentiation de l'entrée de calcium dans les cellules qui expriment TRPC6. Nous démontrons aussi que TRPC6 est phosphorylé suite à une activation de la PKC. Nous identifions dans cette étude que la sérine en position 448 de TRPC6 est le résidu phosphorylé et responsable de l'inhibition par la PKC. Le mutant S448A de TRPC6 n'est plus inhibé ni phosphorylé par la PKC. Cette première étude démontre donc que la phosphorylation dépendante de la PKC de la sérine 448 de TRPC6 médie l'inhibition du canal calcique.

Dans la seconde étude, nous nous intéressons à la phosphorylation basale de TRPC6, qui a été observée au courant de la première étude. L'analyse par spectrométrie de masse a identifié la sérine en position 814 comme étant potentiellement phosphorylée, ce qui a été confirmé par des études de marquage métabolique effectuées sur le mutant S814A de TRPC6. Nous démontrons que la mutation S814A n'affecte pas l'activité de TRPC6. Bien que la S814 fasse partie d'un site consensus de phosphorylation par la CK2, nous montrons également que la CK2 n'est pas impliquée dans la phosphorylation ni la régulation de l'activité de TRPC6.

Ces études ont ainsi permis d'identifier deux nouveaux sites de phosphorylation de TRPC6, soit les sérines 448 et 814. Nous caractérisons également le mécanisme de régulation de TRPC6 par la PKC.

Mots clés : TRPC6, entrée de calcium, signalisation cellulaire, phosphorylation, imagerie calcique.

Identification of the basal and PKC-dependent phosphorylation sites on TRPC6.

By
SIMON BOUSQUET
Department of pharmacology

Thesis presented to the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of the title of *philosophiae doctor* (Ph.D.) in pharmacology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

Intracellular Ca^{2+} is involved in many biological processes in all cells throughout the organism. In non excitable cells, TRPC proteins located at the plasma membrane are calcium channels involved in calcium entry. TRPC6 is particularly studied since its implication in many pathologies, as FSGS, IPAH and some cancers. Its activation and regulation modes and mechanisms are yet fully understood, in spite of the intense research. The purpose of the present study is to investigate the regulation of TRPC6 by phosphorylation. For this, we used metabolic labeling and videomicroscopy techniques in order to evaluate direct TRPC6 phosphorylation and activity. We hence identified a basal as well as a PKC-dependent phosphorylation on TRPC6.

PKC is known to modulate the activity of TRPC1, TRPC3, TRPC4 and TRPC5. Recent studies also showed that TRPC6 is inhibited by PKC. Our first study confirms that activation of PKC leads to TRPC6 activity inhibition. When using GF1, a specific PKC inhibitor, calcium entry in TRPC6-expressing cells is potentiated. We moreover show that TRPC6 is phosphorylated following PKC activation. We identify the serine at position 448 as being phosphorylated and responsible for the PKC-mediated inhibition. The S448A mutant of TRPC6 is no longer phosphorylated nor inhibited by PKC. This first study thus demonstrates that PKC-dependent phosphorylation of serine 448 of TRPC6 mediates channel inhibition.

In the second study, we investigate the basal phosphorylation of TRPC6, which was observed in the first study. Mass spectrometry analysis identified serine 814 as being potentially phosphorylated, a fact confirmed by metabolic labeling assays performed on the S814A mutant of TRPC6. We show that the S814A mutation does not affect TRPC6 activity. Even though the S814 is in a consensus CK2 phosphorylation sequence, we also show that CK2 is not involved in the phosphorylation or the regulation of TRPC6.

These studies thus led to the identification of two new phosphorylations on TRPC6, serine 448 and 814. We also characterized the mechanism by which PKC regulates TRPC6.

Key words: TRPC6, calcium entry, cell signaling, phosphorylation, calcium imaging.

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin

À tous ceux qui m'ont soutenu toutes ces années

À tous ceux qui ont cru en moi

À Catherine, Clara, et les autres à venir, qui font mon bonheur!

Les études graduées...

*Deux mille trois cents ans se sont écoulés depuis
cette époque, et la postérité indécise n'a point
encore porté son jugement :
Adhuc sub judice lis est.*

Chapitre X : Syracuse

Le Speronare

Alexandre Dumas

1842

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES PUBLICATIONS	IX
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XII
INTRODUCTION.....	1
LE CALCIUM.....	1
SIGNALISATION CALCIQUE DANS LES CELLULES NON-EXCITABLES.....	1
L'ENTRÉE DE CALCIUM.....	4
LES CANAUX TRP.....	5
LES ORTHOLOGUES MAMMALIENS DE dTRP.....	6
LES TRPC : MÉCANISMES D'ACTIVATION.....	11
LES TRPC : TOPOLOGIE.....	15
IMPLICATIONS PATHOPHYSIOLOGIQUES DE TRPC6.....	17
RÉGULATION DES TRPC : PHOSPHORYLATION PAR LES KINASES.....	20
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	23
ARTICLE #1- AVANT-PROPOS.....	24
RÉSUMÉ DE L'ARTICLE #1.....	25
ABSTRACT.....	27
INTRODUCTION.....	27
EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	29
RESULTS.....	33
DISCUSSION.....	48

REFERENCES	52
ACKNOWLEDGEMENTS.....	55
ARTICLE #2- AVANT-PROPOS.....	58
RÉSUMÉ DE L'ARTICLE #2.....	59
ABSTRACT.....	61
INTRODUCTION.....	61
EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	63
RESULTS.....	68
DISCUSSION.....	76
ACKNOWLEDGEMENTS.....	77
ABBREVIATIONS.....	78
REFERENCES.....	78
DISCUSSION.....	82
PHOSPHORYLATION DE TRPC6 PAR LA PKC.....	82
PHOSPHORYLATION PAR DIFFÉRENTES ISOZYMES DE LA PKC	83
L'ACTIVATION DE TRPC6 ET DE LA PKC PAR LE DAG.....	85
IDENTIFICATION DU SITE DE PHOSPHORYLATION PAR LA PKC.....	89
LA SÉRINE 448 DE TRPC6 ET LA PKC δ	91
L'ACTIVATION DE LA PKC ET LA SIGNALISATION CALCIQUE.....	93
LA PHOSPHORYLATION BASALE DE TRPC6.....	94
KINASE IMPLIQUÉE DANS LA PHOSPHORYLATION BASALE DE TRPC6.....	96
IMPLICATIONS DE LA PHOSPHORYLATION DE LA SÉRINE 814.....	98
CONCLUSION.....	100

REMERCIEMENTS.....	101
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	102

LISTE DES PUBLICATIONS

Cayouette S, Lussier MP, Mathieu EL, **Bousquet SM**, Boulay G. Exocytotic insertion of TRPC6 channel into plasma membrane upon Gq-protein coupled receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, pp.7241-7146 (2004).

Lepage PK, Lussier MP, Barajas-Martinez H, **Bousquet SM**, Blanchard AP, Francoeur N, Dumaine R, Boulay G. Identification of two domains involved in the assembly of transient receptor potential canonical channels. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281, pp. 30356-30364 (2006).

Lussier MP, Lepage PK, **Bousquet SM**, Boulay G. RNF24, a new TRPC interacting protein, causes the intracellular retention of TRPC. *Cell Calcium*. Vol. 43, pp. 432-443 (2008).

Ilangumaran S, Forand-Boulerice M, **Bousquet SM**, Savard A, Rocheleau P, Chen XL, Dupuis G, Poussier P, Boulay G, Ramanathan S. Loss of GIMAP5 (GTPase of immunity-associated nucleotide binding protein 5) impairs calcium signaling in rat T lymphocytes. *Molecular Immunology*, Vol. 46, pp. 1256-1259 (2009).

Poisson C, Rollin S, Véronneau S, **Bousquet SM**, Larrivée JF, Le Gouill C, Boulay G, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. *Journal of Immunology*. Vol. 183, pp. 2747-2757 (2009).

Cayouette S, **Bousquet SM**, Francoeur N, Dupré E, Monet M, Gagnon H, Guedri YB, Lavoie C, Boulay G. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*. Vol. 1803, pp. 805-812 (2010).

Bousquet SM, Monet M, Boulay G. Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 285, pp. 40534-40543 (2010).

Bousquet SM, Boulay G. Basal phosphorylation of serine 814 of TRPC6. Soumis à *Journal of Cellular Biochemistry*.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Mécanisme général d'entrée calcique dans les cellules non-excitables et principales protéines impliquées dans la signalisation calcique.....	2
Figure 2: Le phénotype <i>trp</i>	7
Figure 3: Arbre phylogénétique représentant les membres de la superfamille des protéines TRP.....	9
Figure 4: Topologie et représentation schématique générale d'un TRPC.....	16
Bousquet <i>et al</i> , 2010, Figure 1 : Inhibition of PKC with GF1 potentiates CCh-induced Ca^{2+} entry into TRPC6-expressing cells.....	34
Bousquet <i>et al</i> , 2010, Figure 2 : PKC modulates agonist-induced Ca^{2+} entry.....	35
Bousquet <i>et al</i> , 2010, Figure 3 : PKC inhibits ROCE.....	37
Bousquet <i>et al</i> , 2010, Figure 4 : PKC inhibits OAG-induced Ca^{2+} entry.....	38
Bousquet <i>et al</i> , 2010, Figure 5 : PKC phosphorylates TRPC6 following a stimulation with CCh.....	40
Bousquet <i>et al</i> , 2010, Figure 6 : The TRPC6 ^{S768A} mutant is inhibited by PKC.....	41
Bousquet <i>et al</i> , 2010, Figure 7 : All PKC-consensus TRPC6 mutants remain potentiated by GF1.....	43
Bousquet <i>et al</i> , 2010, Figure 8 : PKC does not inhibit TRPC6 ^{S448A}	44
Bousquet <i>et al</i> , 2010, Figure 9 : TRPC6 ^{S448A} is not phosphorylated following PKC activation.....	46
Bousquet <i>et al</i> , 2010, Figure 10 : AVP-induced Ca^{2+} entry in A7r5 cells is inhibited by PKC.....	47

Bousquet <i>et al</i> , 2010, Figure 11 : Depletion of PKC δ in A7r5 enhances AVP-induced Ca ²⁺ entry.....	49
Bousquet <i>et al</i> , 2010, Supplementary Table 1 : List of all canonical PKC phosphorylation sites on TRPC6 sequence.....	56
Bousquet <i>et al</i> , 2010, Supplementary Table 2 : GPS2.1 generated PKC δ putative targets on TRPC6 sequence.....	57
Bousquet et Boulay , 2010, Figure 1 : MS/MS identification of potential phosphorylated residues on TRPC6.....	69
Bousquet et Boulay, 2010, Figure 2 : Metabolic labeling of TRPC6 and mutants reveals that Ser814 is phosphorylated.....	71
Bousquet et Boulay, 2010, Figure 3 : The S814A mutation does not alter TRPC6 activity.....	72
Bousquet et Boulay, 2010, Figure 4 : Casein kinase 2 does not phosphorylate TRPC6.....	74
Bousquet et Boulay, 2010, Figure 5 : The inhibition of CK2 with specific inhibitors does not alter TRPC6 activity.....	75
Figure 5. Régulation des TRPC par le DAG et la PKC.....	88
Figure 6. Profil d'hydrophobicité de la séquence murine de TRPC6.....	92

LISTE DES ABRÉVIATIONS

[Ca ²⁺] _i :	Concentration intracellulaire cytosolique de calcium
ARD :	Domaine de répétition similaire à l'ankyrine (<i>ankyrin-like repeats domain</i>)
ATP :	Adénosine triphosphate
CaM :	Calmoduline
CCh :	Carbachol
CHO :	Cellules d'ovaires de hamster chinois (<i>Chinese hamster ovary</i>)
CIF :	Facteur d'influx calcique (<i>calcium influx factor</i>)
CIRB :	Site de liaison de la calmoduline et du récepteur de l'IP ₃ (<i>Calmodulin and IP₃ Receptor Binding site</i>)
CK2 :	Caséine kinase 2
CRAC :	Courant calcique activé par la relâche de Ca ²⁺ (<i>Ca²⁺-release-activated Ca²⁺ current</i>)
DAG :	1,2-diacylglycérol
EGF :	Facteur épidermal de croissance (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR :	Récepteur de l'EGF
FSGS :	Glomérulosclérose focale et segmentale (<i>focal and segmental glomerulosclerosis</i>)
GDP :	Guanosine diphosphate
GMP :	Guanosine monophosphate
GMPc :	Guanosine monophosphate cyclique
GPCR :	Récepteur couplé à une protéine G (<i>G protein coupled receptor</i>)
GqPCR :	Récepteur couplé à une protéine Gq (<i>Gq protein coupled receptor</i>)
GTP :	Guanosine triphosphate
HA :	Antigène de l'hémagglutinine (<i>hemagglutinin antigen</i>)
HBSS :	Solution saline tamponnée à l'Hepes (<i>Hepes buffered salt solution</i>)
HEK :	Cellules embryonnaires humaines de rein (<i>human embryonic kidney</i>)
I _{cat} :	Courant cationique non-sélectif
IP ₃ :	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IP ₃ R :	Récepteur de l'inositol 1,4, 5-trisphosphate
MS :	Spectrométrie de masse (<i>mass spectrometry</i>)
MS/MS :	Spectrométrie de masse en tandem
NCX :	Échangeur sodium/Ca ²⁺ (<i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i>)
NHE :	Échangeur sodium/protons (<i>Na⁺/H⁺ Exchanger</i>)
NOMPC :	<i>No mechanoreceptor potential C</i>
OAG :	1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC :	Protéine kinase C
PLC :	Phospholipase C
PMCA :	Pompe calcique ATPase de la membrane plasmique (<i>Plasma membrane calcium ATPase pump</i>)
RE :	Réticulum endoplasmique
ROC :	Canal activé suite à l'activation d'un récepteur (<i>receptor-operated channel</i>)

ROCE :	Entrée de Ca^{2+} induite par l'activation d'un récepteur (<i>receptor-operated Ca^{2+} entry</i>)
RTK :	Récepteur tyrosine-kinase
SERCA :	Pompe calcique ATPase du réticulum sarcoplasmique endoplasmique (<i>Sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase pump</i>)
SOC :	Canal activé par la déplétion des réserves (<i>store-operated channel</i>)
SOCE :	Entrée de Ca^{2+} induite par la déplétion des réserves (<i>store-operated Ca^{2+} entry</i>)
STIM1 :	<i>Stromal interacting molecule-1</i>
TRP :	<i>Transient receptor potential</i>
TRPA :	<i>Transient receptor potential ankyrin</i>
TRPC :	<i>Transient receptor potential canonical</i>
TRPL :	<i>TRP-like</i>
TRPM :	<i>Transient receptor potential melastatin</i>
TRPML :	<i>Transient receptor potential mucolipin</i>
TRPN :	<i>Transient receptor potential NOMPC</i>
TRPP :	<i>Transient receptor potential polycystin</i>
TRPV :	<i>Transient receptor potential vanilloid</i>
VSMC :	Cellules musculaires lisses vasculaires (<i>vascular smooth muscle cells</i>)

INTRODUCTION

Le calcium

Le calcium (Ca^{2+}) est un cation divalent qui, au niveau cellulaire, joue un rôle de second messager essentiel. En effet, les hausses de concentrations de calcium intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), c'est-à-dire au niveau du cytoplasme, sont traduites par la cellule et induisent une foule de processus cellulaires, tels que l'activation d'enzymes, la contraction et la migration cellulaire, la sécrétion et même la mort cellulaire programmée (Berridge et al., 2000). Ces processus s'échelonnent de la milliseconde jusqu'à plusieurs heures. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est maintenue à de faibles niveaux, évalués à 50 à 100 nM, et c'est la hausse de celle-ci qui enclenche les dits processus. Cette hausse peut être due à deux phénomènes distincts, soit la relâche de calcium des réserves intracellulaires au niveau du réticulum endoplasmique (RE), ou l'entrée de calcium provenant de l'extérieur de la cellule. Ces réservoirs comptent des $[\text{Ca}^{2+}]$ autour de 1 à 2 mM, ce qui représente donc un gradient de 10 000 à 20 000 fois la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Afin de maintenir l'homéostasie calcique, plusieurs protéines s'affairent à abaisser la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en le pompant contre le gradient vers le RE ou l'extérieur de la cellule. Pour ce faire, certaines utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP. Les pompes SERCA (*sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase*) et PMCA (*plasma membrane calcium ATPase*) sont situées sur les membranes du RE et plasmique, respectivement, et repompent le Ca^{2+} hors du cytoplasme vers le RE et l'extérieur de la cellule (Pozzan et al., 1994). L'échangeur NCX (*sodium calcium exchanger*), lui aussi situé à la membrane plasmique, utilise l'énergie du gradient de sodium qu'il laisse entrer pour expulser le calcium (Blaustein et Lederer, 1999).

Signalisation calcique dans les cellules non-excitables

Dans les cellules non-excitables, la mobilisation calcique peut avoir lieu en deux étapes distinctes plus ou moins reliées, selon les protéines qui entrent en jeu (Figure 1). En premier lieu, la relâche est induite suite à une stimulation d'un récepteur couplé à une protéine Gq (GqPCR) ou d'un récepteur tyrosine-kinase (RTK). Le GqPCR activé mène à

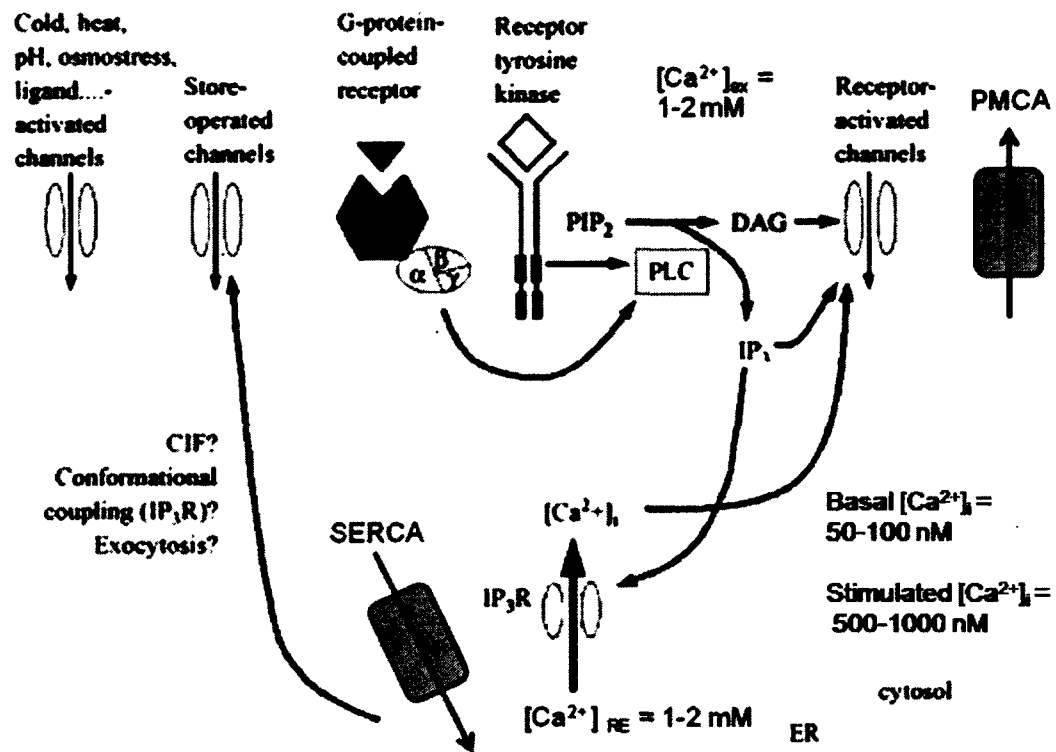


Figure 1. Mécanisme général d'entrée calcique dans les cellules non-excitables et principales protéines impliquées dans la signalisation calcique. Adapté de (Vennekens et al., 2002).

l'activation de la protéine Gq hétérotrimérique, composée des sous-unités α , β et γ . La sous-unité α activée échange son GDP pour un GTP, ce qui mène à la dissociation de la sous-unité α des sous-unités $\beta\gamma$. La sous-unité α -GTP peut alors activer la phospholipase C β (PLC β). D'un autre côté, un agoniste d'un RTK induit la dimérisation de ce dernier et l'autophosphorylation en *trans* de résidus tyrosine. Ces tyrosines phosphorylées permettent l'ancrage et l'activation de la PLC γ via son domaine SH2 (*src homology*). Les PLC activées, β ou γ , hydrolysent le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) ancré dans la membrane plasmique en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃). Le DAG permet l'activation et l'ancrage des protéines kinases C (PKC) tandis que l'IP₃ diffuse dans le cytoplasme et se lie pour activer son récepteur-canal (IP₃R) situé au réticulum endoplasmique. L'IP₃R est un canal tétramérique qui, une fois activé, s'ouvre et permet la relâche de calcium situé dans le RE vers le cytoplasme. La $[Ca^{2+}]_i$ peut alors atteindre 500 à 1000 nM. Les réserves calciques retrouvées dans la cellule peuvent être aussi mobilisées par des molécules autres que l'IP₃. L'ADP-ribose cyclique (cADPR) et l'acide nicotinique adénine dinucléotide phosphate (NAADP) sont deux nucléotides issus des coenzymes nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP), respectivement. Ces molécules sont connues pour engendrer des relâches calciques dans une gamme variée de types cellulaires. Mis à part le récepteur à la ryanodine, leurs cibles sont encore aujourd'hui mal connues [pour revues, voir (Lee, 2001; Lee, 1997)].

La deuxième phase, l'influx ou l'entrée calcique, est un phénomène beaucoup plus complexe qui peut solliciter plusieurs familles de canaux. Ceux-ci sont classifiés suivant leur mode d'activation. Bien qu'ils puissent se retrouver dans des cellules immunitaires et les ostéoblastes (Li et al., 2010; Shao et al., 2009; Suzuki et al., 2010), les canaux calciques dépendants du voltage ne seront pas abordés ici puisqu'ils se retrouvent surtout dans les cellules excitables. Somme toute, la $[Ca^{2+}]_i$ devient donc une balance finement régulée entre la relâche et l'entrée calcique et le repompage du Ca^{2+} vers le RE ou l'extérieur de la cellule.

L'entrée de calcium

Deux mécanismes principaux permettent l'entrée de calcium, le SOCE (*store-operated calcium entry*) et le ROCE (*receptor-operated calcium entry*). Le SOCE est ainsi nommé car la vidange des réserves de calcium est à la source du mécanisme d'entrée. C'est un phénomène initialement identifié et nommé entrée capacitative de calcium ou CCE (*capacitative calcium entry*) par James W. Putney, Jr. (Putney, 1986). Depuis, il a été établi que la baisse de la $[Ca^{2+}]$ dans le RE est détectée par STIM1 (*stromal interacting molecule 1*), protéine récemment identifiée qui compte un domaine EF-hand liant le calcium localisé dans la lumière du RE. Lorsque la $[Ca^{2+}]_{RE}$ diminue, STIM1 perd sa liaison au calcium, ce qui redistribue STIM1 en agrégats localisés appelés *punctae*. Il a d'ailleurs été démontré que des mutations dans le domaine EF-hand prévenant la liaison au calcium provoquaient la perte de la distribution diffuse de STIM1 dans la membrane du RE et favorisaient la formation des *punctae*, sans vidange du RE (Liou et al., 2005). Ces *punctae* se forment dans des régions du RE situées tout près de la membrane plasmique, permettant une interaction directe avec des canaux s'y situant (Liou et al., 2005; Spassova et al., 2006b; Zhang et al., 2005). Il a été démontré que Orai1 situé à la membrane plasmique interagit avec STIM1 (Vig et al., 2006b; Yeromin et al., 2006), pour causer l'entrée de calcium. La co-expression de STIM1 et Orai1 est d'ailleurs suffisante pour induire une augmentation massive et rapide du SOCE dans les cellules HEK293 (Soboloff et al., 2006). Le SOCE est aussi opéré par des canaux TRPC, également situés à la membrane plasmique (Parekh et Putney, 2005; Venkatachalam et al., 2002).

Le ROCE nécessite quant à lui la stimulation d'un récepteur. En effet, la vidange du RE, qui peut être induite par la thapsigargine, un inhibiteur des SERCA, ne réussit pas à activer les canaux ROC (*receptor-operated channel*). Ceux-ci ne s'ouvrent qu'à la suite de l'activation d'un récepteur. Certains canaux TRPC sont responsables de l'entrée ROCE. Une des hypothèses du mécanisme du ROCE est l'activation des TRPC3/6/7 par le DAG produit par les PLC (Dietrich et al., 2005b; Trebak et al., 2003).

Il a été démontré dans les dernières années que STIM1, Orai1 et certains TRPC peuvent interagir entre eux et ainsi modifier les mécanismes d'entrée de calcium (Cahalan, 2009; Lee et al., 2010).

Les canaux TRP

Les protéines TRP (*transient receptor potential*) ont été ainsi nommées suite à la découverte de la protéine du même nom chez *Drosophila melanogaster*, la mouche à fruits. Il avait été noté par Cosens et Manning (Cosens et Manning, 1969) qu'une mutation récessive sur le troisième chromosome créait des électrorétinogrammes anormaux chez les mouches. Sous l'effet d'une stimulation lumineuse, chez les mouches de type sauvage, les auteurs observent une courbe d'électrophysiologie soutenue jusqu'à l'arrêt de la stimulation. Une même stimulation chez les mouches mutantes induit une réponse initiale deux fois plus petite et transitoire (d'où le nom de la protéine *transient*), c'est-à-dire très brève qui revient rapidement au niveau basal même si la stimulation lumineuse est soutenue. Cette mutation empêchait ainsi le cours normal de la transduction du signal visuel. Chez la drosophile, un stimulus lumineux active la rhodopsine qui est un GqPCR, menant à l'activation d'une PLC, induisant l'ouverture de canaux calciques TRP. Ceci entraîne la dépolarisation des membranes des cellules photoréceptrices.

Il est à noter que chez l'humain, dans l'obscurité, les canaux cationiques membranaires (surtout sodiques) sont déjà ouverts, dû à l'abondance de GMPc, ce qui fait que les cellules photoréceptrices sont déjà dépolarisées (environ -40 mV). Cette dépolarisation active des canaux calciques dépendants du voltage, induisant une entrée de calcium permettant la fusion de vésicules et la sécrétion subséquente du neurotransmetteur glutamate. Un stimulus lumineux active la rhodopsine qui active à son tour la protéine G transducine qui échange son GDP lié pour un GTP. La sous-unité α (liée au GTP) de la transducine se dissocie des sous-unités β et γ et active une phosphodiesterase qui hydrolyse le GMPc en GMP. Les canaux sodiques membranaires n'étant plus activés par le GMPc, ils se ferment. Puisque les canaux potassiques continuent à sortir le potassium hors du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule, il y a hyperpolarisation des membranes des cellules photoréceptrices (environ -70 mV), ce qui mène à la fermeture des canaux calciques dépendants du voltage. La baisse de calcium intracellulaire ne permet plus la fusion des vésicules et l'exocytose du glutamate, ce qui entraîne une dépolarisation des cellules bipolaires *ON*, une hyperpolarisation des cellules bipolaires *OFF* et termine ainsi la transduction du signal.

Suite aux travaux de Cosens et Manning, des travaux portant sur des cellules photoréceptrices de drosophile de type sauvage ont démontré par électrophysiologie qu'un stimulus lumineux cause une dépolarisation rapide des membranes, suivie par la formation d'un courant ionique qui est soutenu tant que la stimulation lumineuse est maintenue. Le même protocole effectué sur des cellules photoréceptrices mutantes *trp* démontre que la dépolarisation rapide peut toujours avoir lieu en nécessitant toutefois une stimulation lumineuse dix fois plus intense, mais que la phase plateau est perdue. Chez les cellules issues de mouches de type sauvage, il a été démontré que la phase plateau est sensible au lanthane (La^{3+}), un inhibiteur non-spécifique des canaux calciques, mimant le phénotype *trp* (Hochstrate, 1989; Susstoby et al., 1991) (Figure 2). Des résultats similaires sont obtenus avec les cellules de type sauvage mais dont le milieu extracellulaire est dépourvu de calcium (Hardie et Minke, 1992). Il a donc été suggéré que le gène *trp* codait pour un canal calcique.

Plusieurs années après la découverte du phénotype *trp*, les gènes *trp* et *trpl* de la drosophile sont clonés (Montell et Rubin, 1989; Phillips et al., 1992), permettant ainsi plusieurs études portant sur les protéines dTRP et TRPL. Cette dernière est une protéine possédant une grande homologie avec dTRP, impliquée aussi dans la transduction visuelle et qui est responsable du courant résiduel retrouvé chez les cellules mutantes *trp* (Phillips et al., 1992). L'expression de dTRP dans les cellules d'insecte Sf9 induit un courant calcique suite à la déplétion des réserves de Ca^{2+} par la thapsigargine (Vaca et al., 1994), prouvant son rôle de canal calcique.

Les orthologues mammaliens de dTRP

La découverte et la caractérisation de la protéine dTRP mènent rapidement au clonage de ses orthologues mammaliens. En tout et partout, vingt-huit membres de la superfamille TRP sont répertoriés et subdivisés en sept sous-familles, selon leur identité de séquence. On retrouve les TRPC (*canonical*), les TRPV (*vanilloid*), les TRPM (*melastatin*), les TRPP (*polycystin*), les TRPML (*mucolipin*), les TRPA (*ankyrin*) ainsi que TRPN

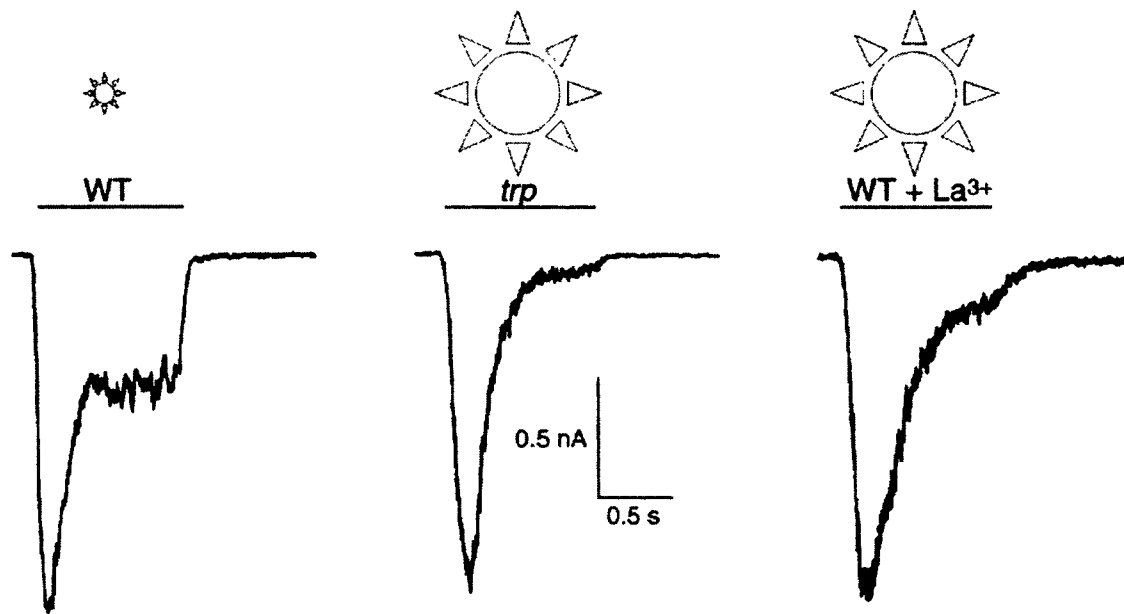


Figure 2. Le phénotype *trp*. Des courants ioniques entrant induits par la lumière sont enregistrés dans des cellules photoréceptrices de mouches de type sauvage (WT), mutantes *trp* ou de type sauvage traitées avec 10 μM La^{3+} (WT + La^{3+}). L'intensité lumineuse est 10 fois plus importante dans les conditions *trp* et WT + La^{3+} . Adapté de (Minke et Selinger, 1996).

(*NOMPC*). La famille des TRPN n'est toutefois pas représentée chez les mammifères (Figure 3).

La sous-famille des TRPC comprend sept membres (TRPC1 à TRPC7) chez les mammifères, où TRPC2 est un pseudogène chez l'humain, mais dont l'expression dans l'organe voméronasal de la souris est essentiel pour la détection des phéromones (Liman et al., 1999). Cette famille est celle qui se rapproche le plus de dTRP. La sous-famille des TRPV compte 6 membres (TRPV1 à TRPV6), dont le membre fondateur TRPV1 est le récepteur de la capsaïcine, molécule responsable du goût piquant des piments forts. TRPV1 à 4 sont thermosensibles, c'est-à-dire activés par la chaleur, alors que TRPV5 et 6 sont responsables de la réabsorption de calcium au niveau des reins et des intestins, respectivement [revue des TRPV (Vriens et al., 2009)].

On dénombre 8 TRPM (TRPM1 à TRPM8), où TRPM6 et 7 sont aussi perméables au magnésium et appelés chanzymes, contraction de *channel* et *enzyme*. Ils possèdent en effet un domaine kinase en C-terminal. TRPM4 et 5 sont des canaux sodiques imperméables au calcium mais activés par le calcium intracellulaire. TRPM8 est activé par le menthol et le froid, d'où la sensation de fraîcheur provoquée par la menthe et ses dérivés. Pour le membre fondateur de cette sous-famille TRPM1, ou mélastatine, son niveau d'expression corrèle négativement avec la progression des mélanomes [revue des TRPM (Kraft et Harteneck, 2005)].

L'expression des membres de la sous-famille de TRPML dans la voie endocytyque permet l'autophagie ainsi que le recyclage des membranes et l'endocytose de matériel extracellulaire, ce qui inclut le recyclage des récepteurs membranaires et des canaux ioniques. Des mutations dans la séquence de TRPML1 causent la mucopolysaccharidose de type IV, caractérisée par un retard psychomoteur et une perte de vision en bas âge [revue des TRPML (Cheng et al., 2010)]. La sous-famille des TRPP est composée d'au moins huit protéines, mais dont seulement trois sont des canaux calciques, soit TRPP2, TRPP3 et TRPP5. Ceux-ci sont aussi nommés polycystines à cause de leur implication dans l'ADPKD (*autosomal dominant polycystic kidney disease*). Des mutations dans TRPP1 et TRPP2 sont responsables de tous les cas (85% et 15%, respectivement) de cette maladie caractérisée par des kystes rénaux (Boucher et Sandford, 2004). TRPP1 n'est par contre

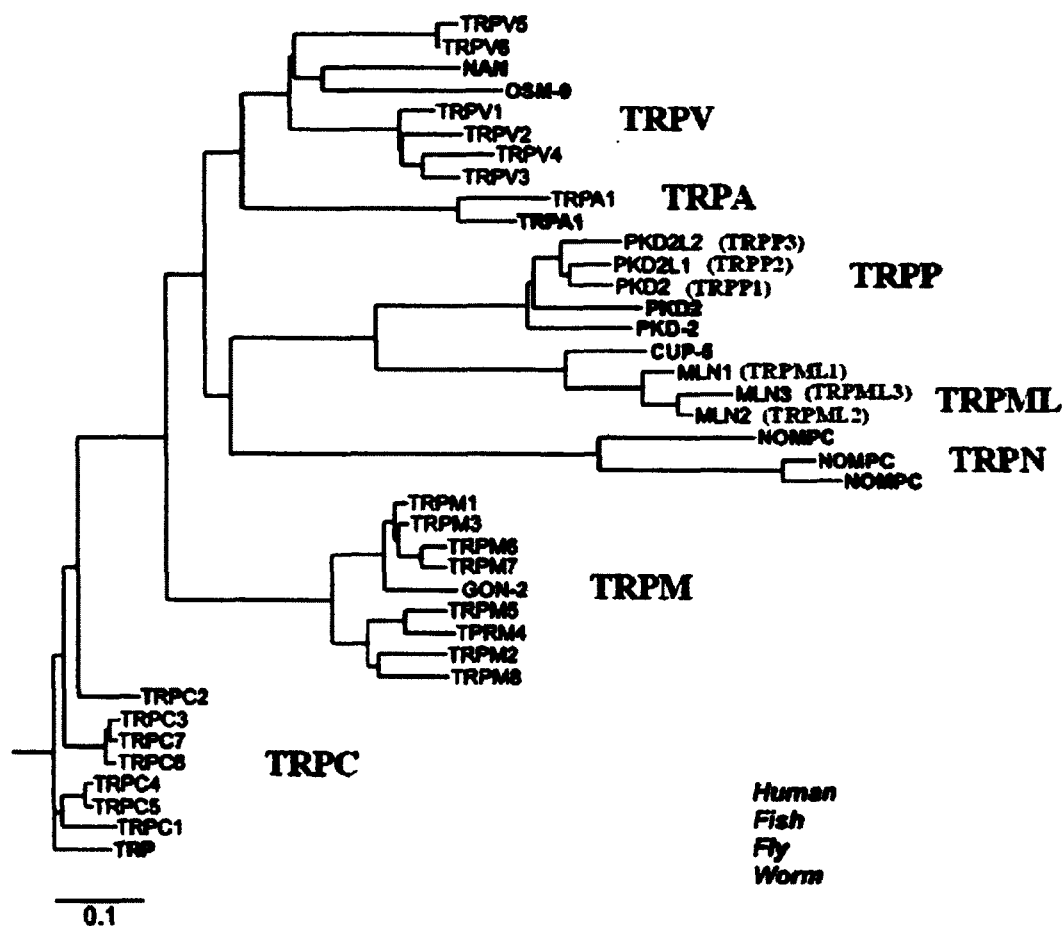


Figure 3. Arbre phylogénétique représentant les membres de la superfamille des protéines TRP. L'échelle représente la distance évolutive entre chacun des membres exprimée en nombre de substitution par acide aminé. L'attention est portée sur les orthologues humains des TRP (en noir), mais quelques membres exprimés chez le poisson (bleu), la mouche (rouge) et le ver (vert) sont aussi représentés. Tiré de (Nilius et Voets, 2005).

pas considéré comme un TRP, dû à sa structure à 11 segments transmembranaires. L'entrée de calcium médiée par TRPP5 serait importante dans la spermatogénèse (Chen et al., 2008).

Bien qu'il y ait deux TRPA chez le *C. elegans* et quatre chez *D. melanogaster*, il n'y a que TRPA1 chez l'humain. Caractérisé par de nombreux domaines de répétitions similaires à l'ankyrine (*ankyrin repeat domain*, ARD), d'où son nom, TRPA1 est activé par des molécules retrouvées dans la moutarde, le wasabi, le raifort et même les gaz lacrymogènes. Il traduit donc le côté piquant ou âcre de ces substances et ses nombreux ARD permettent aussi la transduction des forces mécaniques. Du fait de son expression presque exclusive au niveau des neurones nociceptifs, son inhibition est envisagée pour le traitement de la douleur (García-Añoveros et Nagata, 2007). Enfin, on ne dénombre pas de TRPN chez les mammifères mais on le retrouve chez *C. elegans*, *D. melanogaster* et *D. rerio*, où avec ses 29 ARD il est activé mécaniquement pour médier l'ouïe et la proprioception, chez la mouche du moins (Kernan, 2007).

Tous les TRP, mis à part TRPM4 et 5, sont perméables au calcium mais ce, avec des sélectivités ioniques très variables. TRPV5 et 6 sont les plus sélectifs au calcium, le préférant par un facteur 100 au sodium ($P_{Ca^{2+}} / P_{Na^{+}} > 100$). Pour les TRPC, le rapport de $P_{Ca^{2+}} / P_{Na}$ varie entre 1 et 9 (Nilius et Voets, 2005). Il est d'usage de séparer les TRP en sous-familles, selon leur identité de séquence, mais il est aussi possible de les diviser en fonction de leur mécanisme d'activation. On parle alors de TRP méchanosensibles, thermosensibles, de chanzymes (contraction de *channel* et *enzyme*, puisque ces canaux exhibent une activité enzymatique), etc.

Récemment, il a été établi que des associations inter-familles de TRP sont possibles. Il a été démontré que TRPP2 peut former un canal avec TRPV4 et TRPC1. Avec ce-dernier, TRPP2 forme un tétramère de stœchiométrie 2 : 2, où les sous-unités alternent une après l'autre (Kobori et al., 2009). Il a aussi été montré qu'une mutation de TRPP2 (697fsX-TRPP2) induisant un changement de cadre de lecture produit une protéine avec un C-terminal tronqué. Ceci augmente la localisation du canal à la membrane plasmique et l'interaction avec TRPC3 et TRPC7, induisant une augmentation de l'entrée calcique ROCE, ce qui pourrait favoriser l'apparition de l'ADPKD (Miyagi et al., 2009). Il est à

noter que ces nouvelles interactions sont démontrées dans des modèles d'expression exogène, donc de surexpression. Une chose est sûre, ces associations inter-familles amènent une plus grande variété encore de mécanismes d'activation et de régulation.

Les TRPC : mécanismes d'activation

Premiers orthologues mammaliens de dTRP, les TRPC suscitent l'intérêt de la communauté scientifique puisqu'à leur découverte, on leur attribuait presque l'entière de l'entrée SOCE dans les cellules non-excitables. Nous savons aujourd'hui que tel n'est pas le cas, et qu'une multitude de protéines participent à ce phénomène complexe. Dans l'optique de différencier SOCE et ROCE, les TRPC sont couramment surexprimés ou éteints, dans une gamme variée de types cellulaires. Aussi, de multiples drogues de toutes sortes sont utilisées, comme la thapsigargine, permettant la vidange du RE et induisant ainsi le SOCE. Il est à noter qu'en conditions endogènes, alors que les TRPC et autres canaux sont faiblement exprimés, on ne peut distinguer SOCE et ROCE suite à une stimulation hormonale puisque les deux mécanismes se produisent simultanément. Nous nous devons donc d'être très prudents lorsque nous travaillons dans un modèle cellulaire d'expression recombinante des TRPC.

À ce jour, le mécanisme réel d'activation des TRPC reste inconnu, bien que nombreux soient les efforts déployés pour l'élucider. Trois hypothèses majeures ont été avancées. La première, celle du couplage conformationnel, suggère que les canaux ioniques membranaires interagissent avec les IP₃R situés au RE et que l'activation de ces derniers suite à la liaison de l'IP₃ les activerait, permettant l'entrée de calcium nécessaire pour regarnir les réserves du RE (Berridge, 1990; Irvine, 1990). Ce principe découle du mécanisme d'activation des VDCC (*voltage dependant calcium channel*), retrouvés dans les cellules musculaires striées, qui interagissent directement avec le récepteur à la ryanodine RyR au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique. Des études démontrant l'interaction de la partie N-terminale de l'IP₃R avec le domaine CIRB (*calmodulin - IP₃ receptor binding domain*) en C-terminal des TRPC supportent ce modèle (Boulay et al., 1999; Kiselyov et al., 1999; Kiselyov et al., 1998). Aussi, il a été

suggéré que les effets antagonistes de l'angiopoïétine sur l'augmentation de la perméabilité endothéliale induite par le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) passeraient par une diminution de l'interaction TRPC1-IP₃R, diminuant ainsi l'activation de TRPC1 (Jho et al., 2005). À l'opposé, des études faites dans des cellules DT40 qui n'exprime aucun IP₃R démontrent que TRPC3 peut toujours y être activé (possiblement par le DAG) permettant le ROCE (Venkatachalam et al., 2001). Une autre étude soutient toutefois que le SOCE dépendant de TRPC3 est grandement réduit mais toujours présent, en absence d'IP₃R (Vazquez et al., 2001).

La calmoduline (CaM) interagit aussi avec le domaine CIRB et compétitionne donc avec les IP₃R, ce qui a un effet inhibiteur sur TRPC3 (Zhang et al., 2001). Ceci pourrait être appliqué à tous les TRPC puisqu'ils ont tous été démontrés comme interagissant avec la CaM (Tang et al., 2001). La CaM interagit et médie l'inactivation dépendante du Ca²⁺ de TRPC1 (Singh et al., 2002) tandis que la liaison du complexe Ca²⁺-CaM sur TRPC6 a un effet permissif sur le ROCE, mais aucun sur le SOCE (Boulay, 2002).

Dans le même ordre d'idée d'interactions fonctionnelles, STIM1 et Orai1 sont deux protéines récemment découvertes impliquées dans l'entrée de calcium. STIM1 s'est vu attribuer le rôle de senseur du calcium luminal du RE et activateur d'Orai1, une protéine à quatre segments transmembranaires agissant comme canal et permettant la formation des canaux CRAC (*calcium release-activated calcium current*). Ce courant, I_{CRAC}, est d'ailleurs absent chez les lymphocytes T de patients atteints du déficit immunitaire combiné sévère (SCID), dû à une mutation d'Orai1 (Feske et al., 2006). STIM1 a été découverte dans deux études utilisant des ARN interférents et ciblant l'entrée SOCE (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). La même technique a été utilisée pour identifier le canal responsable du I_{CRAC} et Orai1 a alors été découverte (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006a; Zhang et al., 2006b). L'utilisation de modèles éteints ou de surexpression de STIM1 ou Orai1 a clairement démontré leur implication dans le SOCE. Vu l'entrée de Ca²⁺ résiduelle retrouvée dans les cellules éteintes en STIM1 ou Orai1, plusieurs groupes se sont mis à travailler sur l'interaction de ces deux protéines avec les TRPC. STIM1 a été démontré comme pouvant activer TRPC1 à 6 (Cahalan, 2009), et il a été suggéré que cette interaction favorise l'activité SOCE des TRPC. Trois études du laboratoire du Dr Lutz

Birnbaumer (NIH, Research Triangle Park, Caroline du Nord) ont démontré qu'Orai1 peut interagir avec les TRPC et ceci aurait un rôle à jouer dans le mécanisme d'activation de l'entrée de Ca^{2+} (Liao et al., 2007; Liao et al., 2008; Liao et al., 2009). Depuis, l'hypothèse retenue est que les TRPC s'associent avec Orai1 à la membrane plasmique et permettent le ROCE. Lorsque STIM1 est activé suite à une baisse de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, il va recruter le complexe Orai1:TRPC dans des microdomaines lipidiques où le complexe agirait alors comme un SOC. Toutefois, ce mécanisme dépend de la stoechiométrie de chacune des composantes. En effet, la surexpression de TRPC3 ou 6 rend leur activation indépendante de STIM1 (Yuan et al., 2007). De futures études seront nécessaires pour élucider l'intégralité du mécanisme d'activation et d'interrelation régissant le complexe TRPC:Orai1:STIM1.

Le second mécanisme d'activation des TRPC, appelé modèle exocytotique ou de translocation à la membrane, soutient que les TRPC sont situés dans des vésicules sous la membrane plasmique et que la stimulation des cellules provoque la fusion de ces vésicules pour amener les TRPC à la surface des cellules. Ceci a été avancé quand il a été démontré qu'un analogue non-métabolisable du GTP, essentiel à la fusion de vésicules, avait un effet inhibiteur sur l'entrée de Ca^{2+} (Bird et Putney, 1993; Fasolato et al., 1993). La réorganisation du cytosquelette d'actine en couches sous-membranaires empêche la fusion des vésicules et prévient aussi l'entrée de Ca^{2+} (Patterson et al., 1999). Cette hypothèse d'activation est appuyée par des études démontrant l'interaction de TRPC avec des protéines impliquées dans le routage vésiculaire. SNAP-25 est une protéine connue pour son implication dans l'exocytose. Son clivage, ou l'expression de son dominant négatif, prévient l'entrée de Ca^{2+} dans les oocytes de xénope (Yao et al., 1999). Il a été montré que SNAP-25, mais aussi SNAP-23, la synaptobrévine et la syntaxine interagissent avec TRPC1 ou 3 (Redondo et al., 2004; Singh et al., 2004). L'exocytose a été suggérée par plusieurs études, dont quelques-unes provenant de notre propre laboratoire. Suite à la stimulation de cellules avec un agoniste des récepteurs muscariniques, TRPC3 et TRPC6 surexprimés transloquent à la membrane plasmique (Cayouette et al., 2004; Singh et al., 2004). Il a été démontré que ces TRPC sont situés dans des cavéoles sub-membranaires qui fusionnent avec la membrane suite à la déplétion du RE par une stimulation hormonale ou par l'entremise de la thapsigargine (Cayouette et

al., 2004; Lockwich et al., 2001). Les cavéoles sont des microdomaines de membranes cellulaires composés aussi de cavéoline, une protéine qui interagit d'ailleurs avec TRPC1 (Lockwich et al., 2000). Une étude récente démontre que Rab9 et Rab11, deux petites protéines G impliquées dans les voies d'endocytose et d'exocytose, sont impliquées dans le routage intracellulaire de TRPC6 (Cayouette et al., 2010). Il est toutefois à noter que la translocation de TRPC3 ou 6 induite par la vidange du RE ne mène pas automatiquement à l'activation des canaux (Cayouette et al., 2004; Smyth et al., 2006). TRPC4 et TRPC5 ont aussi été démontrés pour transloquer à la membrane plasmique suite à la stimulation des récepteurs à l'EGF (*endothelial growth factor*) (Bezzarides et al., 2004; Odell et al., 2005).

Le troisième mécanisme suggéré prétend qu'à la suite d'une stimulation cellulaire et de la vidange du RE, un facteur diffusible est relâché du RE et va activer les canaux membranaires responsables du SOCE. C'est l'hypothèse du CIF (*calcium influx factor*) (Randriamampita et Tsien, 1993). Cette hypothèse a été supportée par quelques études démontrant la purification d'un facteur de 600 Da pouvant induire l'entrée de Ca^{2+} . Le CIF est résistant à la chaleur, au pH alcalin et aux protéases, mais sensible aux phosphatases et aux traitements chimiques ciblant les sucres et les nucléotides. Le CIF, extrait et purifié à partir de plaquettes dont les réserves sont déplétées, peut activer des canaux SOC sur d'autres cellules (Trepakova et al., 2000). Il semblerait que le CIF agirait indirectement en délogeant la calmoduline de la iPLA₂ (*inducible phospholipase A2*), l'activant et permettant ainsi la formation de lysophospholipides qui iraient activer les canaux SOC (Smani et al., 2004). Malgré les recherches, l'identité moléculaire du CIF n'a jamais été clairement établie. Cette hypothèse d'activation ne pourra ainsi prendre de l'importance que lorsque l'identité du CIF sera clairement établie et validée. La majorité de la communauté scientifique semble s'entendre pour dire que les canaux SOC, dont les TRPC, sont activés par un mécanisme faisant intervenir à la fois les mécanismes de couplage conformationnel et d'exocytose des canaux.

Les TRPC : topologie

Premier orthologue mammalien de dTRP cloné, TRPC1 humain partage 40% d'identité avec la séquence de dTRP de la mouche à fruit. Bien qu'il partage aussi une certaine similarité de structure avec les canaux dépendants du voltage, les TRPC ne possèdent pas, dans le quatrième segment transmembranaire, les résidus chargés sensibles au potentiel membranaire caractéristiques aux canaux dépendants du voltage (Wes et al., 1995). Suite au clonage et séquençage des TRPC mammaliens, ceux-ci ont été regroupés en quatre sous-groupes, suivant les identités de séquence. TRPC1 et TRPC2 forment chacun un sous-groupe, TRPC3, 6 et 7 un troisième avec 65 à 78% d'identité, alors que TRPC4 et 5 composent le dernier avec 65% d'identité (Ramsey et al., 2006). Il est souvent d'usage d'inclure TRPC1, TRPC4 et 5 dans le même sous-groupe puisque ceux-ci s'associent pour former des tétramères.

Tel que représentés dans la Figure 4, les TRPC possèdent des extrémités N- et C-terminales cytosoliques et une région hydrophobe en N-terminal appelée H1. Ils sont composés de six segments transmembranaires ainsi que d'une région pore entre les cinquième et sixième segments transmembranaires qui permet le passage des ions. En N-terminal, on retrouve quatre ARD et un domaine *coiled-coil* (CC). En C-terminal, on dénombre une région TRP box, hyper-conservée chez plusieurs TRP, le domaine CIRB, un second CC ainsi qu'un domaine PDZ chez TRPC4 et 5. Les deux premières boucles extracellulaires peuvent être N-glycosylées, selon les TRPC. La régulation de TRPC3 et TRPC6 dépend d'ailleurs de ces glycosylations. TRPC3 possède un seul site de glycosylation et une certaine forme d'activité constitutive, mais perd cette activité lorsqu'on lui insère le deuxième site de glycosylation propre à TRPC6. À l'inverse, enlever le site de glycosylation unique à TRPC6 (le deuxième) le rend constitutivement actif (Dietrich et al., 2003). Le mécanisme par lequel la ou les glycosylations ont leurs effets n'est toutefois pas connu.

Afin de former un canal fonctionnel, les TRPC doivent s'associer en tétramères (Birnbaumer et al., 1996; Mio et al., 2005). Ils peuvent tous s'associer en homotétramères, mais l'hétérotétramérisation n'inclut que des sous-unités provenant d'un même sous- groupe en incluant TRPC1 avec TRPC4 et 5. Il semble toutefois que TRPC1

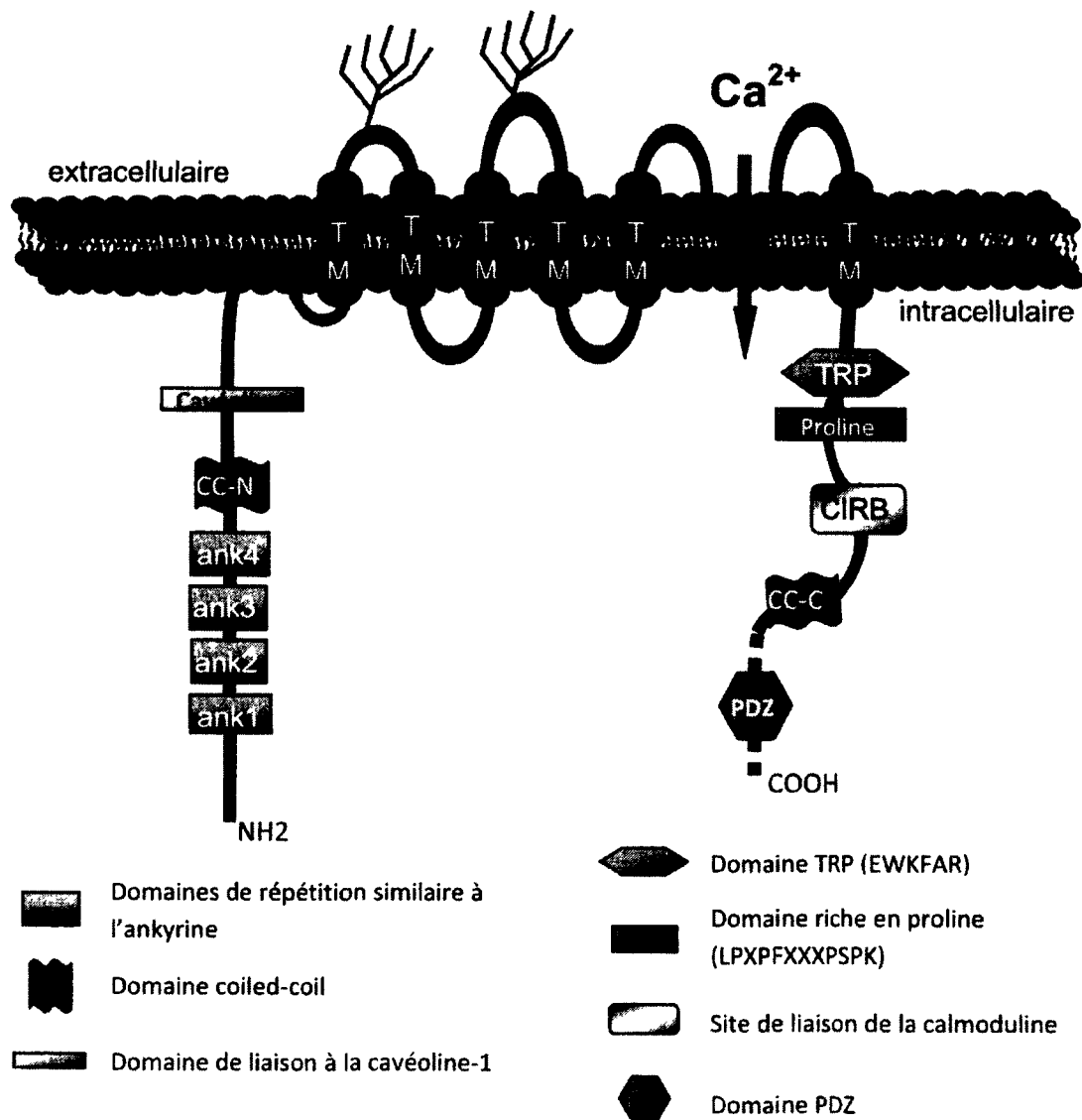


Figure 4. Topologie et représentation schématique générale d'un TRPC.

puisse s'associer avec TRPC3 (Lintschinger et al., 2000; Liu et al., 2005). Toutes ces combinaisons amènent une grande variété de propriétés biophysiques de conductance, de sélectivité ionique et de régulation.

Implications pathophysiologiques de TRPC6.

TRPC6 est connu pour être exprimé dans différents types cellulaires et tissus, entre autres au niveau du système cardiovasculaire. Il est exprimé dans les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), dont les cellules musculaires lisses d'aorte pulmonaire (*pulmonary aortic smooth muscle cells*, PASM) et les cellules A7r5 (musculaires lisses d'aorte thoracique de rat), un modèle d'étude reconnu d'expression de TRPC6. Dans ce dernier modèle, la forte expression de TRPC6 a d'ailleurs été démontrée comme essentielle à l'entrée de calcium induite par la vasopressine (Jung et al., 2002; Mani et al., 2009; Soboloff et al., 2005). Étant un canal calcique, nombre d'études se sont intéressées à TRPC6 pour son implication potentielle dans l'hypertension. Il a d'ailleurs été démontré que la diminution de l'expression de TRPC6 avec un antisens atténue la réponse myogénique, c'est-à-dire la vasoconstriction induite par une pression mécanique, dans des artères cérébrales de rat canulées (Welsh et al., 2002). Par contre, des souris KO pour TRPC6 démontrent étonnamment une élévation de pression artérielle moyenne et de la réponse myogénique mesurées sur des artères isolées (Dietrich et al., 2005a), dû à une surexpression compensatoire de TRPC3, qui possède une activité constitutive plus grande.

En ce qui a trait à l'hypertension artérielle pulmonaire, sa cause principale semble être la prolifération excessive des PASM qui mène à un rétrécissement de la lumière et augmente ainsi la résistance au flux sanguin. Comme les PASM de patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique sont hyperprolifératives et montrent une surexpression de TRPC6, le rôle de TRPC6 dans cette maladie a été investigué. Il s'avère que l'utilisation d'ARN interférent dirigé contre TRPC6 ralentit grandement la prolifération des PASM (Yu et al., 2004). De plus, le bloqueur du récepteur à l'endothéline Bosentan, utilisé cliniquement pour le traitement de l'hypertension artérielle

pulmonaire idiopathique, diminue grandement l'expression de TRPC6, faisant ainsi de TRPC6 une protéine clé dans les mécanismes pro-prolifératifs des cellules de la circulation sanguine pulmonaire (Kunichika et al., 2004). Enfin, une étude a identifié un polymorphisme d'un nucléotide dans le promoteur de TRPC6 associé à l'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique. La mutation identifiée crée la formation d'une séquence de liaison du facteur de transcription pro-inflammatoire NF κ B, augmentant la liaison de ce facteur et favorisant la transcription de TRPC6, ce qui pourrait être un des mécanismes liant TRPC6 à l'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique (Yu et al., 2009).

L'hypertension pulmonaire hypoxique, ou vasoconstriction pulmonaire hypoxique est causée par une diminution de l'apport en oxygène induisant la prolifération des PASMC. L'hypertension et la vasoconstriction subséquentes ont ainsi pour but de rétablir la normoxie. Il a été démontré que les SOCE et ROCE sont augmentés par l'hypoxie chronique dans les PASMC via une plus grande expression de TRPC1 et TRPC6, ce qui contribue à l'augmentation du tonus vasculaire caractéristique aux cas d'hypertension pulmonaire hypoxique (Lin et al., 2004). Ce rôle de TRPC6 dans la vasoconstriction pulmonaire hypoxique a été confirmé alors que des souris TRPC6 $^{-/-}$ ne démontrent plus ce mécanisme essentiel. L'hypoventilation de ces souris mène à une hypoxémie sévère, alors que les souris de type sauvage peuvent supporter le même traitement (Weissmann et al., 2006). Le Sildenafil, aussi connu sous son nom commercial de Viagra, est un inhibiteur de la phosphodiesterase 5 et a été identifié comme étant un agent prometteur dans le traitement de l'hypertension pulmonaire. Il a été démontré que cette molécule réduit l'expression de TRPC6 (et TRPC1), affectant l'homéostasie calcique des PASMC et diminuant ainsi le tonus vasculaire des artères pulmonaires (Lu et al., 2010). TRPC6 semble donc être une bonne cible pour le traitement de l'hypertension pulmonaire.

L'augmentation de l'expression de TRPC6 par l'hypoxie a aussi été observée dans des cellules de glioblastome multiforme, où l'hypoxie pousse ces tumeurs vers des phénotypes plus agressifs et malins. L'inhibition de TRPC6 dans ce type cellulaire atténue la croissance, l'invasion et l'angiogénèse des gliomes (Chigurupati et al., 2010).

TRPC6 a été décrit dans plusieurs autres études comme favorisant la prolifération cellulaire, particulièrement dans des cas de cancer. Il est entre autre hautement exprimé dans les cellules squameuses de carcinome de l'œsophage, où son inhibition supprime la prolifération de ces cellules tumorales et arrête le cycle cellulaire en phase G2/M, c'est-à-dire avant la phase de mitose (Ding et al., 2010). Ceci avait aussi été observé dans des cellules épithéliales humaines de cancer de l'estomac, alors qu'un inhibiteur des TRPC ou bien la surexpression d'une forme dominante-négative de TRPC6 (TRPC6DN) arrêtaient aussi le cycle cellulaire en phase G2/M, inhibant aussi la croissance des cellules. Cette étude démontrait de plus que l'inhibition de TRPC6 supprime la formation de tumeurs gastriques dans les souris nu/nu (Cai et al., 2009). Similairement, l'inhibition de TRPC6 (ou l'expression de TRPC6DN) dans les HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) bloque le cycle cellulaire en G2/M et supprime la prolifération cellulaire et la formation de tubes induites par le VEGF. TRPC6 a donc aussi un rôle à jouer dans l'angiogénèse (Ge et al., 2009; Hamdollah Zadeh et al., 2008). Enfin, il a aussi été démontré que la surexpression de TRPC6 dans des cellules d'hépatome humain accélère la prolifération et l'amplitude du SOCE. Le rôle potentiel de TRPC6 dans l'oncogénèse est appuyé par le fait que son expression est faible dans des hépatocytes issus de sujets sains, alors qu'elle est plus forte dans des échantillons tumoraux tirés de patients cancéreux (El Boustany et al., 2008).

Récemment, des mutations dans TRPC6 ont été démontrées comme étant une cause de FSGS (*focal and segmental glomerulosclerosis*), une maladie rénale caractérisée par une protéinurie due à l'apparition de brèches dans la barrière réno-capillaire (Reiser et al., 2005; Winn et al., 2005). Cette barrière est entre autres composée de podocytes, cellules du glomérule dont les extensions appelées *pieds* s'intercalent autour des capillaires et assurent le contrôle de la perméabilité. TRPC6 interagit avec des protéines structurales du podocyte, dont la néphrine et la podocine, situées dans les pieds du podocyte et contrôlant le *slit diaphragm*, qui est la barrière proprement dite. Au fil des années, de nombreuses mutations ont été identifiées, dont plusieurs augmentent l'activité de TRPC6 [revue TRPC6 et FSGS, (Mukerji et al., 2007)]. La surexpression de TRPC6 est aussi observée dans des cas de glomérulonéphrite membranaire, où on croit que la dérégulation du calcium intracellulaire altère le cytosquelette d'actine, interférant avec le phénotype et la

fonction du podocyte et menant ainsi à la protéinurie. D'ailleurs, la surexpression transitoire de TRPC6 dans les podocytes de souris mène à une protéinurie (Möller et al., 2007).

Régulation des TRPC : phosphorylation par les kinases

La modification post-traductionnelle est un moyen couramment employé par la cellule pour modifier l'activité, le routage, la localisation spatiale et la dégradation d'une protéine. L'ubiquitinylation, l'ajout d'acides gras comme des groupements farnésyl ou géranyl, et la glycosylation en sont quelques exemples. La phosphorylation est certes le plus étudié et probablement le plus retrouvé dans la cellule. Les TRPC ont presque tous été démontrés pour être phosphorylés par une kinase ou une autre, affectant ainsi leur stabilité, leur routage ou leur activité.

Il a été montré que TRPC1 doit être phosphorylé par la PKC α afin d'être actif, ce qui est nécessaire à l'entrée de calcium et la perméabilité endothéliale induite par la thrombine (Ahmed et al., 2004). Cette phosphorylation est aussi essentielle à l'activation du SOCE dépendant de TRPC1 par le PIP₂ dans les myocytes de veine porte de lapin (Saleh et al., 2009a) ou dans les myocytes de l'artère coronaire de lapin (Saleh et al., 2009b). La tyrosine-kinase Src joue un rôle similaire sur TRPC3, alors que l'activité de ce canal n'est plus observée si exprimé dans des lignées cellulaires déficientes pour Src ou sous l'effet d'inhibition de Src (Vazquez et al., 2004). Le rôle de la PKC dans la régulation de TRPC3 a été démontré à maintes reprises. L'activité de TRPC3 est diminuée en présence d'activateur de PKC, et augmentée en présence d'inhibiteurs spécifiques (Venkatachalam et al., 2003). Trebak *et al.* ont montré que la PKC opère un mode de rétroaction négative sur TRPC3 en le phosphorylant sur sa Ser712. Alors que TRPC3 de type sauvage est inhibé suite à l'activation de la PKC par le PMA, le mutant S712A devient insensible à la PKC (Trebak et al., 2005). L'équipe du Pr Xiao Qiang Yao (*Chinese University of Hong Kong*) s'est intéressé à la régulation de TRPC3 par la protéine kinase G (PKG). Ils démontrent que l'activation de la PKG par l'application de GMPc inhibe l'entrée SOCE dans des cellules HEK293 surexprimant TRPC3 et la PKG. Ceci est toutefois prévenu par

un traitement avec des inhibiteurs spécifiques de la PKG, KT5823 et H8. Ils ont aussi identifié les sites de phosphorylation, soit les Thr11 et Ser263, alors que les mutants alanine ne sont plus phosphorylés *in vitro* et ne sont plus affectés par le GMPc (Kwan et al., 2004). Ils ont plus tard relié leurs résultats avec ceux de Trebak pour démontrer qu'une partie de l'inhibition dépendante de la PKC de TRPC3 passait par l'activation de la PKG, alors que l'inhibition induite par le PMA est en partie prévenue par un traitement inhibant la PKG ou par les mutations T11A ou S263A (Kwan et al., 2006).

TRPC4 est phosphorylé par une tyrosine-kinase de la famille de Src (STK), la kinase Fyn, sur ses résidus 959 et 972. Cette phosphorylation induite par la stimulation des cellules à l'EGF favorise la translocation de TRPC4 à la membrane plasmique et son interaction avec le facteur de régulation de l'échangeur sodium/protons (NHERF). L'entrée de calcium devient réduite dans les cellules traitées aux inhibiteurs de STK ou dans celles exprimant les mutants Y959/972F (Odell et al., 2005). La PKC peut phosphoryler TRPC5 sur sa Thr972 suite à la stimulation des récepteurs muscariniques, ce qui désensibilise le canal calcique. L'inhibition de la PKC par l'utilisation du GF1 (bisindolylmaléimide I, inhibiteur spécifique aux PKC) ou d'un peptide inhibiteur, ou encore l'expression du mutant T972A, prévient ou ralentit la désensibilisation de TRPC5 (Zhu et al., 2005).

Tout comme pour TRPC4, TRPC6 peut être phosphorylé par Fyn sur un résidu tyrosine, ce qui augmente son activité (Hisatsune et al., 2004). Bien qu'il ait été montré que TRPC6 puisse être phosphorylé par la protéine kinase A (PKA), il semblerait que cette phosphorylation n'ait pas d'effet sur son activité (Hassock et al., 2002). À l'instar de TRPC3, la PKG phosphoryle TRPC6 sur la Thr69, ce qui diminue son activité (Takahashi et al., 2008). Ceci est confirmé par une seconde étude qui soutient aussi que cette phosphorylation bloque l'activation de NFAT, réduisant ainsi l'expression de TRPC6. La PKG agirait ainsi comme frein à l'activation et l'expression de TRPC6 (Koitabashi et al., 2010). La phosphorylation de TRPC6 par la PKG sur le résidu Thr69 serait aussi tributaire des effets anti-hypertrophiques induits par l'inhibition de la phosphodiesterase 5 (PDE5). En effet, il est connu que la PDE5 promeut l'hypertrophie cardiaque, ce qui est prévenu par l'inhibition de cette enzyme. La substitution de la Thr69 de TRPC6 pour une alanine abolit les effets anti-hypertrophiques des inhibiteurs de PDE5, faisant de TRPC6

une cible thérapeutique pour la prévention de l'hypertrophie cardiaque pathologique (Nishida et al., 2010). Ceci est appuyé par une étude similaire établissant le rôle de la phosphorylation de la Thr69 par la PKG dans l'effet anti-hypertrophique de la voie peptides natriurétiques-guanylyl cyclase A (Kinoshita et al., 2010). La régulation de TRPC6 par la PKC a été suggérée depuis longtemps, sans toutefois avoir été confirmée. Dans une étude suggérant aussi une phosphorylation par la calmoduline kinase II (CaMKII), Shi *et al.* démontrent par électrophysiologie que l'inactivation de TRPC6 est ralentie par l'inhibition pharmacologique de la PKC (Shi et al., 2004), ce qui est aussi remarqué par deux autres équipes (Saleh et al., 2006; Zhang et al., 2006a). Cette phosphorylation est démontrée pour avoir lieu sur le résidu Ser768 de TRPC6, l'équivalent de la Ser712 de TRPC3, et la déphosphorylation est opérée par la calcineurine (Kim et Saffen, 2005). Par contre, les études précédemment citées n'ont pas été en mesure de démontrer que le mutant S768A de TRPC6 n'est plus affecté par la PKC, ce qui serait la confirmation que c'est bel et bien le site d'action de la PKC sur TRPC6.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Il est maintenant clair que l'expression et l'activité de TRPC6 ont des rôles à jouer dans plusieurs pathologies, dont l'hypertension pulmonaire, certains cancers et la glomérulosclérose focale et segmentale. Puisque ces maladies impliquent généralement une augmentation de l'expression et de l'activité de TRPC6, comprendre la régulation de TRPC6 nous rapproche du but ultime, soit la mise au point d'une molécule faisant de TRPC6 une cible thérapeutique. La régulation de TRPC6 par les kinases est un aspect qui a été abordé par quelques équipes, sans que les études en découlant n'avancent grandement l'état des connaissances.

La PKC semble inhiber TRPC6 mais ce phénomène n'était pas bien compris, pas plus que la localisation de la phosphorylation. Nous nous sommes donc proposés d'investiguer la régulation de TRPC6 par la PKC. Nous vérifions que la modulation de la PKC augmente ou diminue l'entrée de calcium, dépendamment de l'utilisation d'inhibiteurs ou d'activateurs de la PKC, respectivement. Nous confirmons, par des études de marquage métabolique, que la PKC phosphoryle TRPC6. Enfin, nous identifions le résidu touché par la phosphorylation, et confirmons son implication dans la régulation par la PKC de TRPC6, par des essais de mesures de calcium intracellulaire et de marquage métabolique.

Dans un deuxième temps, nous montrons que TRPC6 est phosphorylé de façon basale, c'est-à-dire sans stimulation cellulaire. Nous investiguons aussi cette phosphorylation et ses effets sur l'activité de TRPC6.

ARTICLE #1 – AVANT-PROPOS

Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition.

Auteurs : Simon M. Bousquet, Michaël Monet et Guylain Boulay

Statut : Paru dans *Journal of Biological Chemistry*, le 24 décembre 2010, 285(52):40534-43.

Avant-propos :

J'ai effectué la grande majorité des expériences, ainsi que leur analyse. J'ai participé à l'écriture et à la préparation du manuscrit.

Cité comme : Bousquet *et al*, 2010.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE #1

TRPC6 est un canal cationique dans la membrane plasmique qui joue un rôle dans l'entrée de calcium suivant la stimulation d'un récepteur couplé à une protéine Gq ou d'un récepteur tyrosine-kinase. Une dérégulation de l'activité de TRPC6 cause la prolifération anormale des cellules musculaires lisses et la glomérulosclérose. Dans la présente étude, nous investiguons la régulation de l'activité de TRPC6 par la protéine kinase C (PKC). Nous démontrons que l'inhibition de la PKC par le GF1 ou son activation avec le phorbol 12-myristate 13-acétate augmente ou inhibe, respectivement, l'entrée de Ca^{2+} induite par un agoniste dans les cellules exprimant TRPC6. Des résultats similaires sont obtenus quand TRPC6 est directement activé avec le 1-oléyl-2-acétyl-sn-glycérol. L'activation des cellules avec le carbachol augmente la phosphorylation de TRPC6, un effet qui est prévenu par l'inhibition de la PKC. Le résidu cible de la PKC a été identifié par un balayage alanine de tous les sites canoniques de la PKC sur TRPC6. De façon inattendue, tous les mutants, incluant TRPC6^{S768A} (un résidu préalablement proposé pour être la cible de la PKC), ont démontré une inhibition dépendante de la PKC de leur activité canal. Un logiciel de prédiction de sites de phosphorylation a suggéré que la Ser⁴⁴⁸, située dans une séquence non-canonique de la PKC, est une cible potentielle pour la PKC δ . Des expériences d'entrée de Ba^{2+} et de Ca^{2+} ont révélé que le GF1 n'augmente pas l'activité de TRPC6^{S448A}. Chez les cellules musculaires lisses vasculaires A7r5 qui expriment TRPC6 de façon endogène, nous observons qu'une isoforme nouvelle de PKC inhibe l'entrée de Ca^{2+} induite par la vasopressine. De plus, la réduction de l'expression de la PKC δ dans les cellules A7r5 amplifie l'entrée de Ca^{2+} vasopressine-induite. En résumé, nous démontrons que la PKC δ exerce un effet de rétrocontrôle négatif sur TRPC6 via la phosphorylation de la Ser⁴⁴⁸.

ABSTRACT

TRPC6 is a cation channel in the plasma membrane that plays a role in Ca^{2+} entry following the stimulation of a Gq-protein coupled or tyrosine kinase receptor. A dysregulation of TRPC6 activity causes abnormal proliferation of smooth muscle cells and glomerulosclerosis. In the present study, we investigated the regulation of TRPC6 activity by protein kinase C (PKC). We showed that inhibiting PKC with GF1 or activating it with phorbol 12-myristate 13-acetate potentiated and inhibited agonist-induced Ca^{2+} entry, respectively, into cells expressing TRPC6. Similar results were obtained when TRPC6 was directly activated with 1-oleyl-2-acetyl-sn-glycerol. Activation of the cells with carbachol increased the phosphorylation of TRPC6, an effect that was prevented by the inhibition of PKC. The target residue of PKC was identified by an alanine screen of all canonical PKC sites on TRPC6. Unexpectedly, all the mutants, including TRPC6^{S768A} (a residue previously proposed to be a target for PKC), displayed PKC-dependent inhibition of channel activity. Phosphorylation prediction software suggested that Ser⁴⁴⁸, in a non-canonical PKC consensus sequence, was a potential target for PKC δ . Ba^{2+} and Ca^{2+} entry experiments revealed that GF1 did not potentiate TRPC6^{S448A} activity. Moreover, activation of PKC did not enhance the phosphorylation state of TRPC6^{S448A}. Using A7r5 vascular smooth muscle cells, which endogenously express TRPC6, we observed that a novel PKC isoform is involved in the inhibition of the vasopressin-induced Ca^{2+} entry. Furthermore, knocking down PKC δ in A7r5 cells potentiated vasopressin-induced Ca^{2+} entry. In summary, we provide evidence that PKC δ exerts a negative feedback effect on TRPC6 through the phosphorylation of Ser⁴⁴⁸.

INTRODUCTION

Ca^{2+} is a second messenger in all cell types. While the intracellular concentration of Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) is tightly controlled and normally maintained at low levels, increases modulate cellular functions such as secretion, gene transcription, and the activation of a variety of effectors (1). TRPC6 allows Ca^{2+} to enter cells from the extracellular medium when it is stimulated by the phospholipase C/inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) pathway. This channel

is a member of the TRPC family (transient receptor potential canonical), which includes seven members (TRPC1 to TRPC7). Many pathophysiologies arise when TRPC6 expression or activity is dysregulated. Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is a channelopathy associated with TRPC6 and is caused by missense mutations, including gain-of-function mutations (2,3). In some cases of idiopathic pulmonary arterial hypertension, the expression of TRPC6 has been reported to be higher in pulmonary artery smooth muscle cells (4,5). An upregulation of TRPC6 in hepatocytes has also been linked to liver cancer (6). These examples stress the importance of understanding the mechanisms responsible for the regulation of TRPC6.

The exact mechanism by which TRPC6 is activated is not clear, but it occurs when a GqPCR or tyrosine kinase receptor is activated, leading to IP₃ and diacylglycerol (DAG) formation from phosphatidyl-4,5-bisphosphate (PIP₂) hydrolysis by phospholipase C. IP₃ binds to its receptor, IP₃R, on the endoplasmic reticulum leading to Ca²⁺ release, which is the first phase of Ca²⁺ mobilization. The second phase takes place as Ca²⁺ channels, including TRPCs and Orai (7,8), are activated at the plasma membrane and maintain high intracellular Ca²⁺ levels as long as the stimulation is sustained. DAG, along with Ca²⁺, activates protein kinase C (PKC), which regulates the activity of many proteins involved in Ca²⁺ signaling, including IP₃R (9,10), L-type Ca²⁺ channels (11), and TRP proteins (12). Trebak *et al.* showed that TRPC3, the closest relative of TRPC6, is phosphorylated on residue Ser⁷¹² by PKC (13), and that the activation of PKC by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) inhibits 1-oleyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG)-mediated TRPC3 channel activation (13).

It has been shown that TRPC6 is negatively regulated after phosphorylation of threonine 69 by PKG (14). This phosphorylation event is also essential for the anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibitors (15-17). Since phosphorylation events play an important role in TRPC6 activity, we verified, in the present study, whether TRPC6 was a substrate for PKC. We showed that PKC can phosphorylate TRPC6 and that the

inhibition of PKC by bisindolylmaleimide I (GF1) or Gö 6983 enhances agonist-induced Ca^{2+} entry into TRPC6-expressing cells. Mutagenesis studies showed that none of the twelve canonical phosphorylation sites for PKC exposed to the intracellular environment is involved in the phosphorylation of TRPC6. Further analysis of the TRPC6 sequence suggested that PKC δ can phosphorylate TRPC6 on Ser⁴⁴⁸, a non-canonical phosphorylation site for PKC. The mutation of Ser⁴⁴⁸ to Ala abolished the ability of PKC to phosphorylate TRPC6. In addition, agonist-induced Ca^{2+} entry into cells expressing TRPC6^{S448A} was not modified by GF1. Furthermore, we showed that PKC δ regulates vasopressin (AVP)-induced Ca^{2+} entry into A7r5 cells, which endogenously express TRPC6. In summary, we demonstrated that TRPC6 is phosphorylated on a non-canonical site by PKC *in cellulo* and that this phosphorylation down-regulates the activity of TRPC6.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Material- Cell culture media, serum, Hepes, trypsin, Opti-MEM I, LipofectAMINE 2000, Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Med GC, and Zero Blunt Topo PCR cloning kits were purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Phosphate-free culture media and G418 were from Wisent (St-Bruno, QC, Canada). NP-40 was from Roche (Laval, QC, Canada). GF1, Gö 6976, Gö 6983, carbachol (CCh), arginine vasopressin (AVP), phosphatase cocktail inhibitor set #2 and fura 2/AM were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). PKC δ siRNA (ON-TARGETplus siRNA duplex, 5'-GCAACGCUGCCAUCCAUAUU-3' (sense) and 5'-CUUAUGGAUGGCAGCGUUGCUU-3' (antisense)) were from Dharmacon (Chicago, IL, USA). Rabbit polyclonal and mouse monoclonal anti-hemagglutinin (HA)-specific antibodies were from Covance (Berkeley, CA, USA). Rabbit polyclonal anti-TRPC6 was from Chemicon (Temecula, CA, USA). Rabbit polyclonal anti-PKC δ (C-17) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibodies, peroxidase-conjugated sheep anti-mouse antibodies, protein A-sepharose CL-4B, and Biomax MR films were from GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC, Canada). Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, 0.2 μm nitrocellulose membrane, and ³²P-

orthophosphoric acid were from Perkin–Elmer Life Sciences (Woodbridge, ON, Canada). All primers and oligonucleotides were from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Phusion High-Fidelity DNA polymerase was from Finnzymes (Espoo, Finland). Restriction enzymes and T4 DNA ligase were from New England Biolab (Pickering, ON, Canada). Unless otherwise stated, all other reagents were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) or Laboratoire MAT (Quebec City, QC, Canada).

Molecular biology- Standard molecular biology techniques were used for to isolate, analyze, and clone DNA (18,19). Point mutations in mouse TRPC6 were introduced using a PCR-based site-directed mutagenesis strategy. The PCR fragment was subcloned into the pCR-Blunt II-TOPO vector using a Zero Blunt TOPO PCR cloning-kit. The fragment was sequenced and was then introduced into HA-tagged TRPC6 in pcDNA3.1. All constructs were confirmed by sequencing from double-stranded DNA templates using the dideoxynucleotide termination method (20).

Cell culture and transfection- HEK293T cells and A7r5 vascular myocytes were maintained at subconfluence in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml of penicillin, and 50 µg/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. T6.11 cells (HEK293 stably transfected with mouse TRPC6) were cultured in the same medium supplemented with G418 (400 µg/ml). For transient transfections, six-well plates were treated with 0.1 mg/ml poly-L-lysine for 30 min, rinsed with PBS (137 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4), and air-dried. A total of 1 µg of plasmid DNA per well was added in 250 µl Opti-MEM I, to which 2.5 µl of LipofectAMINE 2000 diluted in 250 µl of Opti-MEM I was added and thoroughly mixed. After a 20-min incubation, 8×10^5 HEK293T cells diluted in 1.5 ml of culture medium without antibiotics were added per well. The cells were incubated for 16 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After a 24-h transfection period, the cells from one well were transferred onto 3 poly-L-lysine coated coverslips for $[Ca^{2+}]_i$ measurements or into a 60-mm Petri dish for metabolic labeling assays. Transfection of A7r5 cells with siRNA were performed 24 h after the cells were plated at 1.5×10^5

cells/poly-L-lysine-treated wells (six-well plate). siRNA were diluted in 250 μ l of Opti-MEM I and added to each well before adding 5 μ l of LipofectAMINE 2000 diluted in 250 μ l of Opti-MEM I. Final concentration of siRNA was 50 nM. The mixture was incubated for 20 min at room temperature before addition to the A7r5 cells. The siRNA-LipofectAMINE 2000 complex was incubated with A7r5 cells for 48 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Metabolic labeling- Stably or transiently transfected cells grown in 60-mm Petri dishes were washed once with phosphate-free DMEM and incubated for 4 h in phosphate-free DMEM supplemented with 250 μ Ci/ml ³²P-inorganic phosphate. The stimulations were performed by adding directly the agonists at 100X in the media. After the appropriate incubation time, the cells were washed twice with ice-cold PBS prior to being lysed.

Immunoprecipitation- The cells were lysed with 1 ml of ice-cold lysis buffer (1.25% NP-40, 1.25% sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 12.5 mM sodium phosphate, pH 7.2, 1 μ g/ml of soybean trypsin inhibitor, 5 μ g/ml of leupeptin, 100 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride) supplemented with a phosphatase inhibitor cocktail for 30 min on ice with gentle agitation. They were then scraped from the surface of the Petri dish and centrifuged at 15 000 x g for 15 min at 4°C. The supernatant was collected and immunoprecipitated with 50 μ l of protein A-sepharose beads (50% slurry) and anti-HA mouse antibody (1:1000) for 2 h at 4°C. Samples were then centrifuged for 1 min at 4°C at 800 x g and washed twice with 500 μ l of ice-cold lysis buffer. Immunoprecipitated proteins were dissolved in 40 μ l of 2X Laemmli buffer and boiled for 5 min before being separated on 7% SDS-polyacrylamide gels. The gels were then either dried and exposed to a film for autoradiography or the protein bands were transferred to a 0.2 μ m nitrocellulose membrane (400 mA for 2 h or 100 mA overnight in 150 mM glycine, 20 mM Tris-base, and 20% methanol) for immunoblotting.

Immunoblots- The nitrocellulose membranes to which the whole cell lysates and immunoprecipitated proteins had been transferred were stained with Ponceau S (0.1% in 5% acetic acid) to visualize the marker proteins, destained in TBST (20 mM Tris-HCl, pH

7.5, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and blocked in TBST containing 5% (w/v) nonfat dry milk for either 1 h at room temperature or overnight at 4°C. The membranes were then washed and incubated in TBST for either 2.5 h at room temperature or overnight at 4°C with specific primary antibodies (rabbit anti-HA (1:1000) or mouse anti-actin (1:10 000)). After three washes with TBST, the membranes were incubated for 1.5 h at room temperature in TBST containing peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit-IgG (1:30 000) or peroxidase-conjugated sheep anti-mouse-IgG (1:10 000). The blots were washed three times with TBST and the immune complexes were detected with the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus kit using the manufacturer's protocol.

Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ - We used the method described by Zhu *et al.* (21) to measure $[Ca^{2+}]_i$. Briefly, A7r5, T6.11, or transfected HEK293T cells grown on poly-L-lysine-treated coverslips were washed twice with HBSS (120 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 0.8 mM $MgSO_4$, 10 mM glucose, 1.8 mM $CaCl_2$, 20 mM Hepes, pH 7.4) and loaded with fura 2/AM (1.5 μ M in HBSS) for 20 min at room temperature in the dark. After washing and de-esterifying in fresh HBSS for 20 min at room temperature, the coverslips were inserted in a circular open-bottom chamber and placed on the stage of a Zeiss Axovert microscope fitted with an Attotfluor Digital Imaging and Photometry System (Attotfluor Inc., Rockville, MD, USA). The $[Ca^{2+}]_i$ in selected fura 2-loaded cells was measured by fluorescence videomicroscopy at room temperature using alternating excitation wavelengths of 334 and 380 nm (10 nm bandpass filters), and emitted fluorescence was monitored through a 510 nm dichroic mirror and a 520 nm long pass filter set. Free $[Ca^{2+}]_i$ was calculated from the 334/380 fluorescence ratios using the method of Grynkiewicz *et al.* (22). Reagents were diluted to their final concentrations in HBSS and applied to the cells by surface perfusion. Ca^{2+} -free HBSS was supplemented with 0.5 mM EGTA to chelate any remaining extracellular Ca^{2+} . For the Ba^{2+} entry assays, 1 mM Ba^{2+} was added to Ca^{2+} -free, EGTA-free HBSS. For the transient transfections, the cells were co-transfected with cDNA encoding the M5 muscarinic receptor, and only those responding to carbachol (CCh) were analyzed. $[Ca^{2+}]_i$ values were recorded every 3 s.

RESULTS

We first investigated whether the inhibition of PKC could modulate CCh-induced Ca^{2+} mobilization in HEK 293 cells stably transfected with mTRPC6 (T6.11 cells) (23). As shown in Figure 1A, in the presence of extracellular Ca^{2+} , 50 μM CCh caused a robust increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from a basal value of approximately 70 nM to a peak value of approximately 210 nM. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ then declined slowly and remained above the basal level for several minutes, which constituted a plateau phase. When the cells were pre-treated with 100 nM GF1, a highly selective PKC inhibitor, the CCh-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reached a peak value similar to that of untreated cells. However, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ remained elevated at a plateau of approximately 220 nM. In control HEK293 cells expressing angiotensin II receptor type 1 instead of TRPC6, the CCh-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was similar to that of the T6.11 cells, but the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ declined quickly to a plateau level of 130 nM within 45 s after the stimulation (Fig. 1B). Under the same conditions, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the T6.11 cells after 45 s was 165 nM (Fig. 1A). In HEK293 cells expressing the angiotensin II receptor type 1, GF1 slightly increased the peak $[\text{Ca}^{2+}]_i$, but Ca^{2+} levels quickly returned to values similar to those of untreated cells (Fig. 1B).

To discriminate between CCh-induced Ca^{2+} release and CCh-induced Ca^{2+} entry, we used a Ca^{2+} depletion / Ca^{2+} readdition protocol. Cells were incubated for 30 s in Ca^{2+} -free medium containing 0.5 mM EGTA before depleting the intracellular Ca^{2+} stores with 5 μM CCh. Once the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ had returned to the basal level (2 min after the addition of CCh), the extracellular medium was replaced with medium containing 1.8 mM CaCl_2 . As shown in Figure 2, in the absence of extracellular Ca^{2+} , CCh-induced Ca^{2+} release was similar in TRPC6- and mock-transfected cells. When 1.8 mM CaCl_2 was added to TRPC6-transfected cells, Ca^{2+} entry raised the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to a plateau level of approximately 190 nM (Fig. 2A). In the mock-transfected cells, the Ca^{2+} entry raised the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to a lower plateau level of approximately 160 nM. Pre-treating the cells with GF1 increased CCh-induced net Ca^{2+} entry by 52.4 ± 13.1 nM and 21.9 ± 10.0 nM in TRPC6- and mock-transfected cells, respectively (Fig. 2B). Net Ca^{2+} entry was calculated by subtracting the

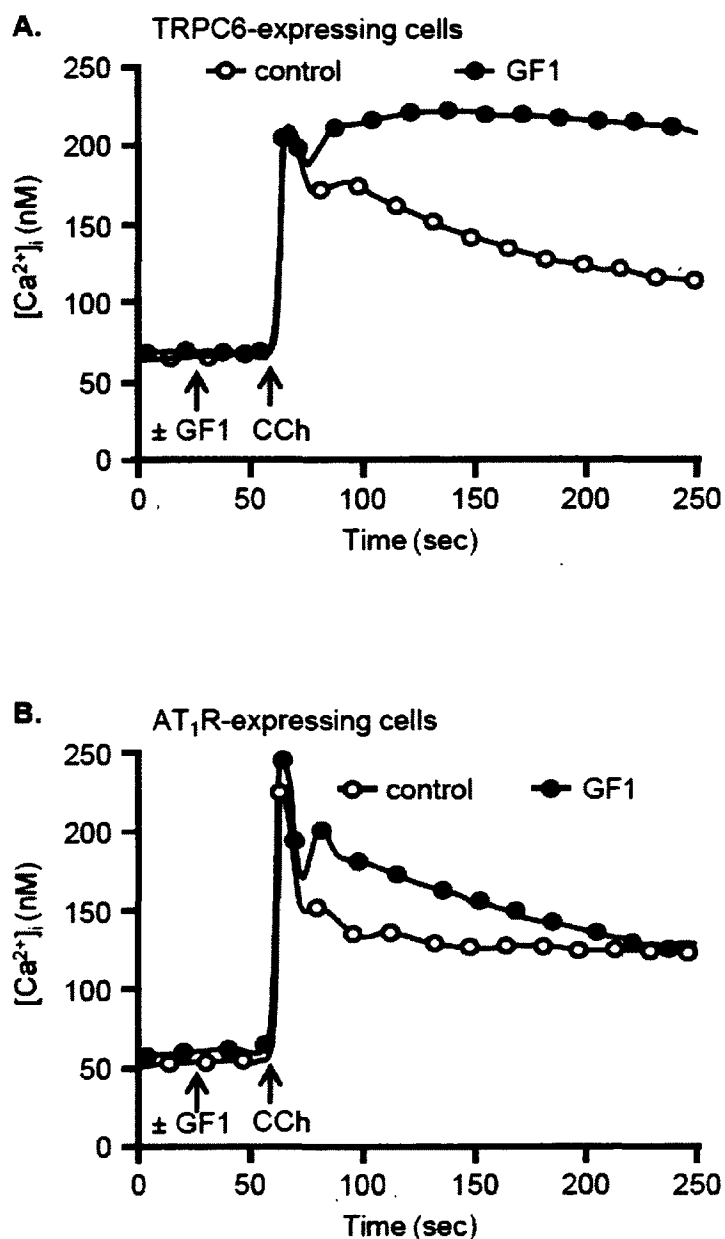


Figure 1. Inhibition of PKC with GF1 potentiates CCh-induced Ca^{2+} entry into TRPC6-expressing cells. A, Monitoring of $[Ca^{2+}]_i$ in T6.11 cells loaded with Fura-2. Cells were treated with 100 nM GF1 (filled circles) or not (open circles) for 30 s before stimulating them with 50 μ M CCh in the presence of extracellular Ca^{2+} . The graphs represent the average of 244 to 247 cells from three independent experiments. B, HEK293 cells overexpressing AT₁R were used as a negative control for TRPC6 expression and were treated and stimulated as in A. The graphs represent the average \pm SD of 517 to 588 cells from three independent experiments.

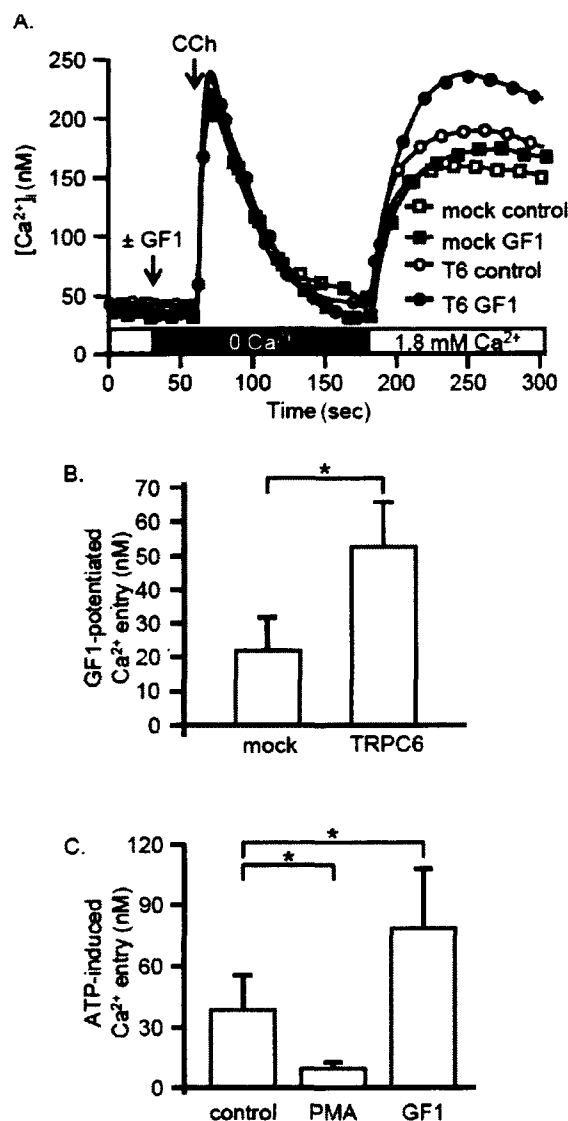


Figure 2. PKC modulates agonist-induced Ca^{2+} entry. A, $[Ca^{2+}]_i$ values were recorded in HEK293T transiently transfected with pcDNA3 (square) or TRPC6 (circle). Cells were incubated in the absence of extracellular Ca^{2+} (in the presence of 0.5 mM EGTA) for 30 s before being stimulated with 5 μ M CCh. External Ca^{2+} (1.8 mM) was restored after 180 s. Cells were treated with 100 nM GF1 (filled symbols) or not (open symbols) for 30 s before being stimulated. Graphs represent the average of 87 to 171 cells from four independent experiments. B, Maximal CCh-induced net Ca^{2+} entry values were calculated by subtracting the basal $[Ca^{2+}]_i$ value (average of the two values before Ca^{2+} restoration) from the average of the three maximal $[Ca^{2+}]_i$ values after Ca^{2+} was restored. GF1-potentiated Ca^{2+} entry was calculated by subtracting the net control Ca^{2+} entry value from net GF1 entry value. The histogram represents the average \pm SD of four independent experiments. C, ATP-induced (100 μ M) net Ca^{2+} entry values were calculated as in B. Cells were pretreated or not with 100 nM PMA or 100 nM GF1. The histograms represent the average \pm SD of five independent experiments. * $P < 0.03$.

basal $[Ca^{2+}]_i$ from the maximal $[Ca^{2+}]_i$ recorded once the Ca^{2+} had been restored. These results suggested that the inhibition of PKC causes increased TRPC6 activity and that PKC exerts an inhibitory effect on TRPC6. We next investigated how the activation of PKC with PMA could influence TRPC6-mediated Ca^{2+} entry. Because PMA greatly decreased CCh-induced IP_3 production in the T6.11 cells (data not shown), we performed the Ca^{2+} depletion / Ca^{2+} readdition protocol by stimulating the cells with 100 μM ATP. As shown in Figure 2C, ATP caused a net Ca^{2+} entry of 38.4 ± 16.5 nM while a pretreatment of the cells with GF1 increased ATP-induced net Ca^{2+} entry to 78.7 ± 28.7 nM. The presence of PMA before the stimulation with ATP reduced Ca^{2+} entry by 75% to a net Ca^{2+} entry of 9.2 ± 3.7 nM. These results further suggested that PKC decreases the activity of TRPC6.

To confirm that the observed effect of PKC was due to a direct regulation of TRPC6, we exploited two characteristics that are distinctive of TRPC6. First, it has been shown that CCh generates a marked increase in receptor-operated Ca^{2+} entry (ROCE) in addition to store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) in HEK293 cells overexpressing TRPC6 (23). The depletion of the intracellular Ca^{2+} store was induced with 1 μM thapsigargin, an irreversible inhibitor of the SERCA that causes a rapid leak of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum and triggers store-operated channels. Figure 3A shows that after an incubation of T6.11 cells with thapsigargin for 5 min, which completely depleted the intracellular Ca^{2+} store (24,25), 50 μM CCh caused an increase in $[Ca^{2+}]_i$ to a peak value of 245 nM, which slowly declined to a value of 140 nM 2 min after the addition of CCh. In the presence of GF1, CCh still caused an increase in $[Ca^{2+}]_i$ to a peak value similar to that of control cells, but the $[Ca^{2+}]_i$ remained at a plateau value of 265 nM for at least 2 min after the addition of CCh. The net Ca^{2+} entry measured 2 min after the addition of CCh was 18.2 ± 11.5 nM in untreated cells and 136.6 ± 14.1 in GF1-treated cells (Fig. 3B).

Another distinctive characteristic of TRPC6 is that it can be activated by high concentrations of OAG, a non-metabolizable DAG analogue (26-28). Figure 4A shows

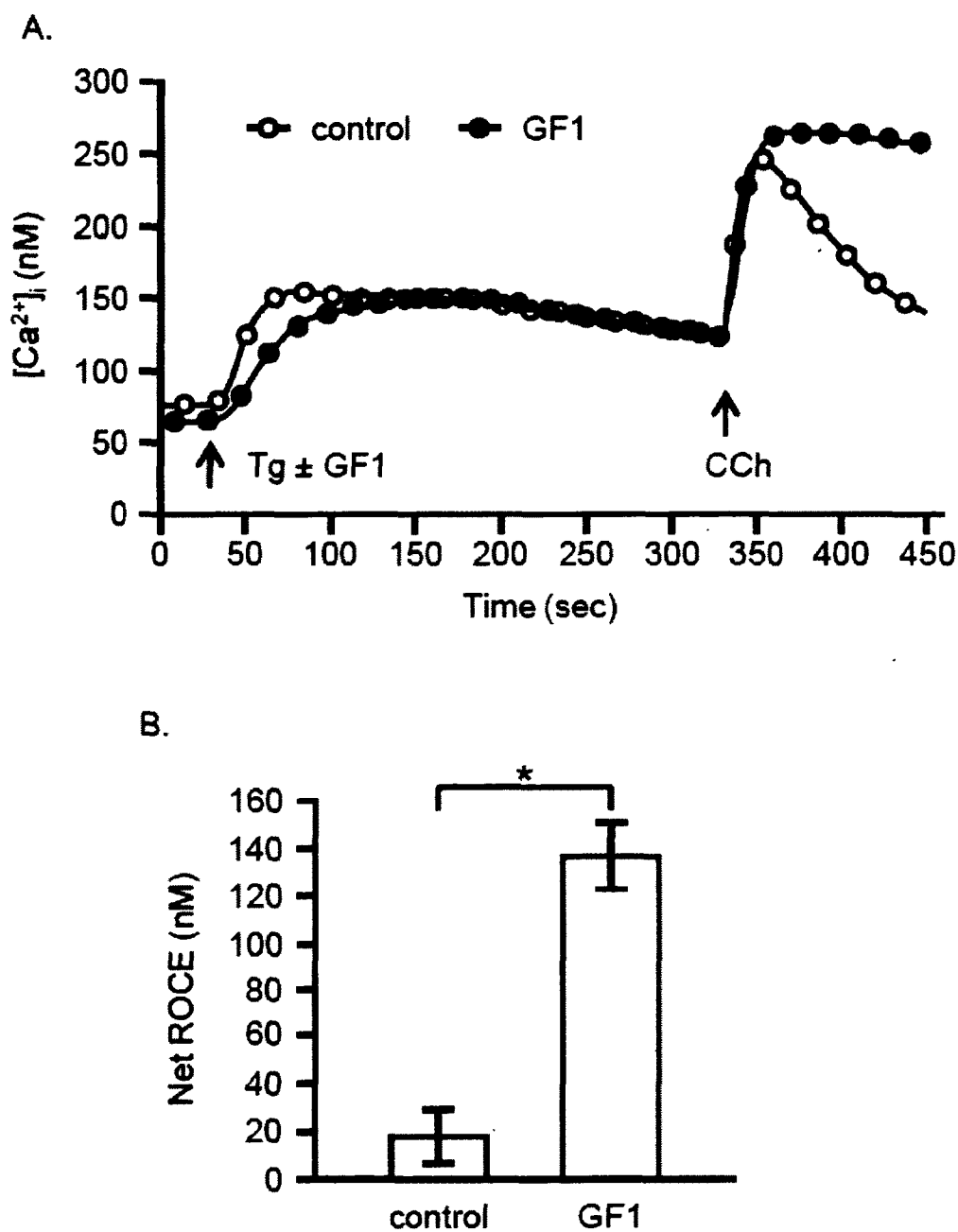


Figure 3. **PKC inhibits ROCE.** A, Fura-2 loaded T6.11 cells were stimulated with 1 μ M thapsigargin in the presence of extracellular Ca^{2+} to induce store depletion and SOCE. CCh (50 μ M) induced ROCE after 330 s. Cells were co-incubated with 100 nM GF1 (filled circle) or not (open circle) and thapsigargin. The graphs represent the average of 484 to 497 cells from six independent experiments. B, Net ROCEs were calculated by subtracting the basal $[Ca^{2+}]_i$ value (average of two values before the CCh was added) from the average of three $[Ca^{2+}]_i$ values recorded 2 min after the CCh was added. The histograms represent the average \pm SD of six independent experiments. * $P < 0.01$.

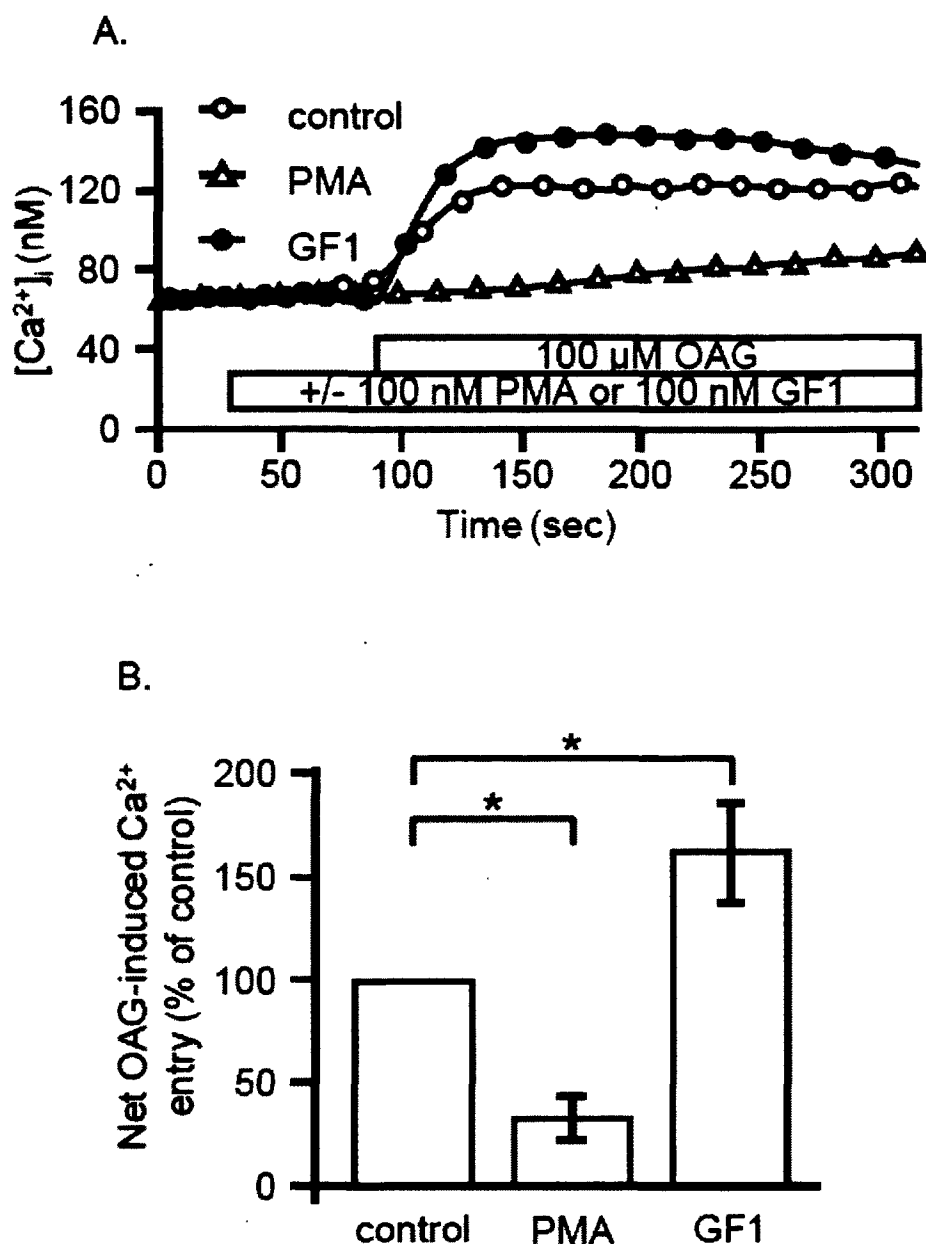


Figure 4. **PKC inhibits OAG-induced Ca^{2+} entry.** A, Fura-2 loaded T6.11 cells were pretreated with 100 nM PMA (open triangles), 100 nM GF1 (filled circles), or not (open circles) for 60 s and were then stimulated with 100 μ M OAG in the presence of extracellular Ca^{2+} . The graphs represent the average of 178 to 213 cells from a typical experiment ($n=3$). B, OAG-induced net Ca^{2+} entry values after 2.5 min were calculated by subtracting the basal $[Ca^{2+}]_i$ value (average of two values before the OAG was added) from the average $[Ca^{2+}]_i$ values after 237-243 s. The values calculated for the PMA and GF1 treatments are reported with respect to the control condition. The histograms represent the average \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.02$.

100 μ M OAG caused a slow elevation of $[Ca^{2+}]_i$ that reached a value of 122 nM in 1 min. in T6.11 cells. In the presence of 100 nM PMA, OAG-induced Ca^{2+} entry decreased to $33.3 \pm 11.0\%$ of that of control cells (Fig. 4B). In the presence of 100 nM GF1, OAG-induced Ca^{2+} entry increased to 144 nM (Fig. 4A), which corresponds to a relative elevation of $162.3 \pm 24.1\%$ of that of control cells (Fig. 4B). These results further suggested that PKC down-regulates the activity of TRPC6.

To determine whether PKC phosphorylates TRPC6 *in cellulo*, HEK293 cells expressing TRPC6 were metabolically labeled using ^{32}P -orthophosphate. PKC was then activated through the stimulation of the muscarinic receptor with 50 μ M CCh. Figure 5A shows that the immunoprecipitated TRPC6 was weakly phosphorylated under basal conditions. CCh increased the phosphorylation level of TRPC6 by 1.34 ± 0.17 fold, compared to the basal level (Fig. 5B). To further determine whether CCh-induced TRPC6 phosphorylation was due to PKC, cells were pre-incubated for 5 min with GF1 before the stimulation with CCh. GF1 did not modify the basal level of phosphorylation of TRPC6 (0.97 ± 0.05 times the basal level), but it completely inhibited the effect of CCh on TRPC6 phosphorylation (0.98 ± 0.13 times the basal level) (Fig. 5A-B). These results suggested that CCh-induced TRPC6 phosphorylation occurs through a PKC-dependent pathway.

It has previously been shown that the phosphorylation of Ser⁷¹² in TRPC3 by PKC abolishes TRPC3 activity (13). Since Ser⁷¹² in TRPC3 is part of a highly conserved five-residue motif (PS⁷¹²PKS) common to all TRPC members, we first substituted the equivalent residue (S⁷⁶⁸) of TRPC6 for alanine. Since Ba²⁺ is a poor substrate for ATPase pumps (29), and its influx is weak through endogenous channels in HEK293 cells, we measured the activity of TRPC6 and TRPC6^{S768A} using a Ca²⁺ depletion/ Ba²⁺ readdition protocol. Cells were incubated for 30 s in Ca²⁺-free medium containing 0.5 mM EGTA before depleting the intracellular Ca²⁺ stores with 5 μ M CCh. Once the $[Ca^{2+}]_i$ had returned to the basal level (2 min after the addition of CCh), 1.0 mM Ba²⁺ was added extracellularly. After CCh-induced Ca²⁺ store depletion, mock-transfected cells displayed

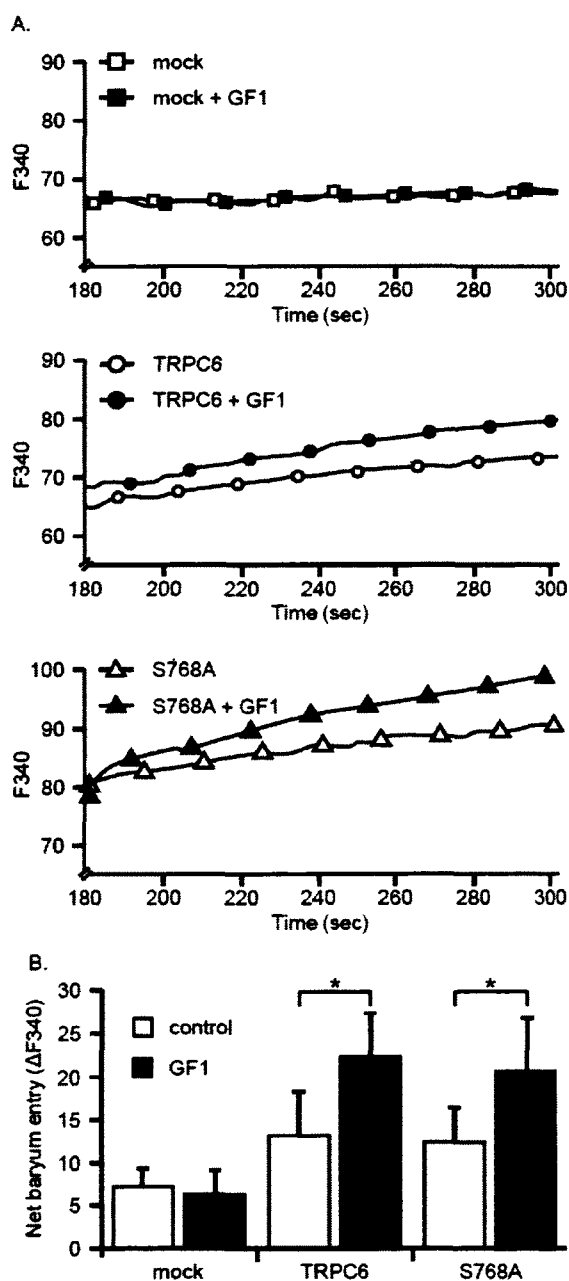


Figure 6. The TRPC6^{S768A} mutant is inhibited by PKC. A, HEK293T cells transiently transfected with pcDNA3 (upper panel), TRPC6 (middle panel), or TRPC6^{S768A} (lower panel) were stimulated with 5 μ M CCh as in Figure 2A. However, rather than Ca^{2+} , 1 mM BaCl_2 was added to assess entry after 180 s. Emitted fluorescence following excitation at 340 nm was monitored and graphed. Cells were treated with 100 nM GF1 (filled symbols) or not (open symbols) for 30 s before being stimulated with 50 μ M CCh. The graphs represent the average of 37 to 64 cells from a typical experiment ($n=3$). B, The net increase in F340 (ΔF_{340}) was calculated by subtracting the basal F340 value (average of two values after 174-177 s) from the average of three values after 294-300 sec. The histograms are the average \pm SD of three to six independent experiments. * $P < 0.03$.

very weak Ba^{2+} entry that was not modified in the presence of GF1 (Fig. 6A, upper panel). In the case of TRPC6-expressing cells, CCh induced steady Ba^{2+} entry that was potentiated by GF1 (Fig. 6A, middle panel). Unexpectedly, in the case of TRPC6^{S768A}-expressing cells, CCh induced steady Ba^{2+} entry that was also potentiated by GF1 (Fig. 6A, lower panel). Figure 6B shows the net fluorescence (ΔF_{340}) increase recorded 2 min after the addition of Ba^{2+} . These results indicated that Ser⁷⁶⁸ is not involved in the PKC-mediated inhibition of TRPC6.

Since the amino acid sequence of TRPC6 contains 11 other intracellular consensus motifs (S/T-X-R/K) for PKC phosphorylation (supplementary Table 1), we next individually substituted all the serine and threonine residues for alanine and evaluated the functionality of the mutant channels and their sensitivity to PKC. Mutants TRPC6^{T629A} and TRPC6^{S928A} were poorly expressed and their activity could not be evaluated. Figure 7 shows that GF1 could potentiate Ba^{2+} entry through wild-type TRPC6 as well as all the TRPC6 mutants. These results suggested that none of the conventional PKC phosphorylation motifs is involved in the modulation of TRPC6 by PKC.

GPS2.1 computational software (30) predicts that PKC δ could phosphorylate TRPC6 on four additional putative phosphorylation sites (supplementary Table 2). We mutated two of these, Thr⁶⁹ and Ser⁴⁴⁸, into Ala and investigated the impact on GF1-potentiated TRPC6 activity. GF1 potentiated CCh-induced Ba^{2+} entry into cells expressing TRPC6^{T69A} (data not shown). Interestingly, however, CCh-induced Ba^{2+} entry was not potentiated by GF1 in cells expressing TRPC6^{S448A} (Fig. 8A). The activity of TRPC6^{S448A} was also investigated by measuring CCh-induced Ca^{2+} entry, which was higher in cells expressing TRPC6^{S448A} than in cells expressing TRPC6 (Fig. 8B). PKC (activated by CCh) likely did not exert its inhibitory effect on mutant TRPC6^{S448A}. In support of this interpretation, Figure 8B also shows that GF1 did not modify CCh-induced Ca^{2+} entry into cells expressing TRPC6^{S448A} whereas it potentiated CCh-induced Ca^{2+} entry into cells expressing TRPC6. As shown in Figure 2B, GF1 only slightly enhanced CCh-induced

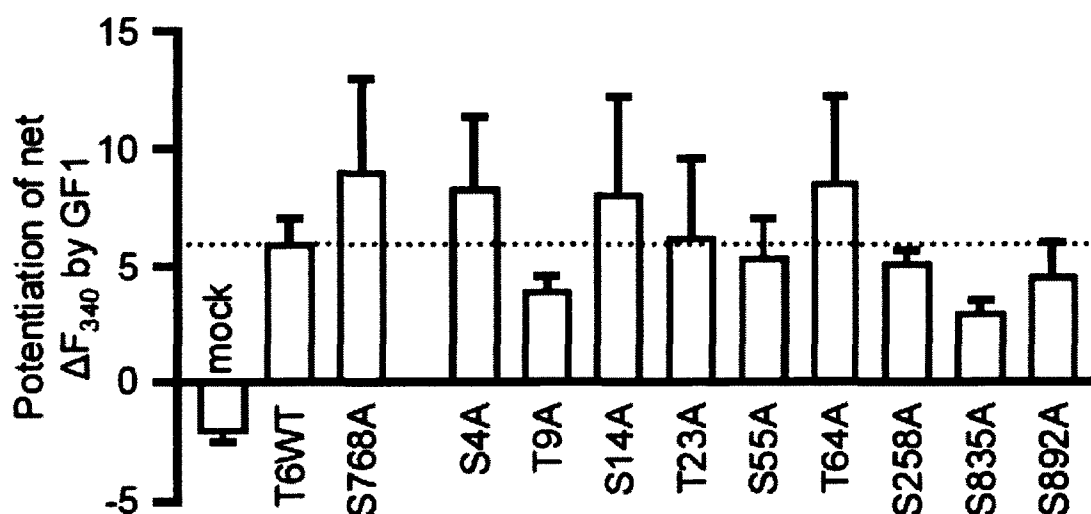


Figure 7. All PKC-consensus TRPC6 mutants remain potentiated by GF1. HEK293T cells transiently transfected with pcDNA3 (mock), TRPC6 (T6WT), or mutant TRPC6 were stimulated with 5 μ M CCh, and Ba^{2+} entry was monitored as described in Figure 6. Net Ba^{2+} entry was calculated by subtracting the basal F340 value (average of two values before adding the Ba^{2+}) from the average of three values taken 114-120 s after adding the Ba^{2+} . GF1-potentiated Ba^{2+} entry was calculated by subtracting the net Ba^{2+} entry value under control conditions from the net Ba^{2+} entry value after the pretreatment with GF1. The histograms represent the potentiating effect of GF1 on CCh-induced Ba^{2+} entry. The values are the average \pm SEM from two to four independent experiments for the mutants and fourteen independent experiments for the mock and TRPC6 conditions.

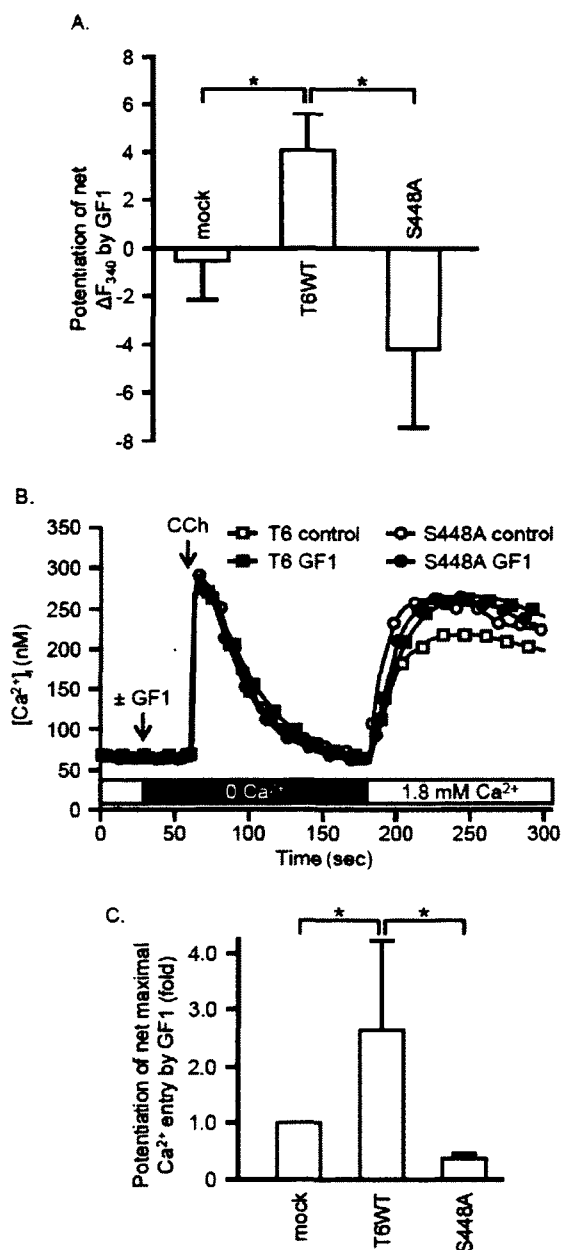


Figure 8. PKC does not inhibit TRPC6^{S448A}. A, HEK293T cells transiently transfected with pcDNA3, TRPC6, or TRPC6^{S448A} were treated or not with 100 nM GF1 and then stimulated with 5 μ M CCh for 120 s before adding 1 mM BaCl₂. Net GF1-induced potentiation of ΔF_{340} was calculated (see Figures 6 and 7) and graphed as the average \pm SD of three independent experiments. B, HEK293T cells transiently transfected with pcDNA3 (not shown), TRPC6 (squares), or TRPC6^{S448A} (circles) were treated with 100 nM GF1 (filled symbols) or not (open symbols) and were stimulated with 5 μ M CCh for 120 s before extracellular Ca^{2+} was restored to allow Ca^{2+} entry. The graphs represent the average of 28 to 58 cells from a typical experiment (N=4). C, The histograms represent the relative potentiation of GF1 of CCh-induced net Ca^{2+} entry compared to the mock-transfected cells (average \pm SD of four independent experiments). * $P < 0.03$.

Ca²⁺ entry in mock-transfected cells whereas in cells expressing TRPC6, it potentiated CCh-induced Ca²⁺ entry 2.65 ± 1.57 fold compared to mock-transfected cells (Fig. 8C). However, in cells expressing TRPC6^{S448A}, GF1 barely increased CCh-induced Ca²⁺ entry compared to mock-transfected cells (0.37 ± 0.09 -fold) (Fig. 8C). These results demonstrated that Ser⁴⁴⁸ mutation abolishes the sensitivity of TRPC6 to PKC.

To investigate whether TRPC6^{S448A} is a substrate for PKC, HEK293 cells were metabolically labeled using ³²P-orthophosphate. Under these conditions, PMA increased the phosphorylation level of TRPC6 (Fig. 9A) 1.63 ± 0.20 -fold over the basal phosphorylation level. In addition, the increase was prevented in the presence of GF1 (1.07 ± 0.22 -fold over the basal level) (Fig. 9B). Under the same conditions, the basal phosphorylation level of TRPC6^{S448A} was similar to that of TRPC6 (1.01 ± 0.19), while PMA had no effect (1.18 ± 0.23) (Fig. 9B). As expected, GF1 did not modify the phosphorylation level of TRPC6^{S448A} in the presence of PMA (1.16 ± 0.27). These results suggested that Ser⁴⁴⁸ of TRPC6 is phosphorylated by PKC and is responsible for the PKC-mediated inhibition of TRPC6.

It has previously been shown that the A7r5 cells express high levels of TRPC6 and that knockdown of TRPC6 decreases AVP-induced Ca²⁺ entry by 50% to 70% (31-33). We investigated the influence of PKC on AVP-induced Ca²⁺ entry in A7r5 cells. Using the Ca²⁺ depletion / Ca²⁺ readdition protocol, we showed that 100 nM AVP caused a net Ca²⁺ entry of 82.6 ± 26.3 nM 2 min after extracellular Ca²⁺ was restored. PMA (100 nM) did not alter the Ca²⁺ release phase (Fig. 10A). However, net AVP-induced Ca²⁺ entry decreased to 21.2 ± 12.2 nM in cells pre-treated with PMA (Fig. 10C). To evaluate the implication of novel PKC isoforms in the inhibition of AVP-induced Ca²⁺ entry, we used the two structurally similar PKC inhibitors, Gö 6983 and Gö 6976. Gö 6983 can inhibit conventional PKC and novel PKC with similar potencies whereas Gö 6976 is inactive on novel PKC (34,35). Figure 10B and C show that 100 nM AVP caused a net Ca²⁺ entry (amplitude of 90.1 ± 17.4 nM) measured 2 min after extracellular Ca²⁺ was restored. In

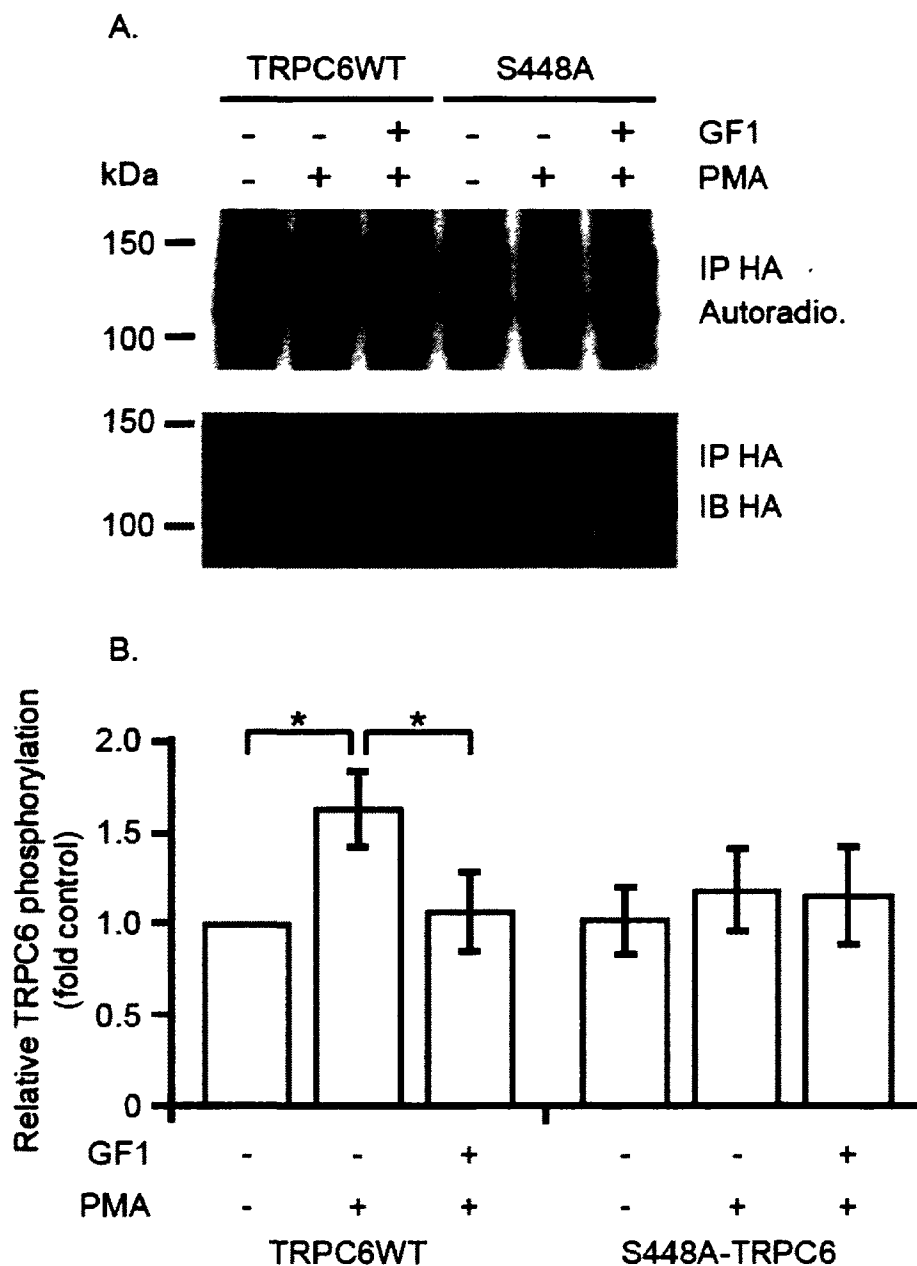


Figure 9. TRPC6^{S448A} is not phosphorylated following PKC activation. A, HEK293T cells transiently transfected with TRPC6 or TRPC6^{S448A} were metabolically labeled, treated with 500 nM GF1 or not for 5 min, and then stimulated with 1 μ M PMA or not for 5 min. Autoradiography (upper panel) to assess phosphorylation or immunoblotting (lower panel) of TRPC6 was performed to determine the quantity of TRPC6 in the immunoprecipitate (representative of four independent experiments). B, The histograms represent the relative amount of TRPC6 phosphorylated, calculated as the ratio of phospho-TRPC6 (determined by densitometric analyses of autoradiograms) to total TRPC6 (determined by scan and quantification of the immunoblot signals) for each sample (average \pm SD of four independent experiments). * $P < 0.01$.

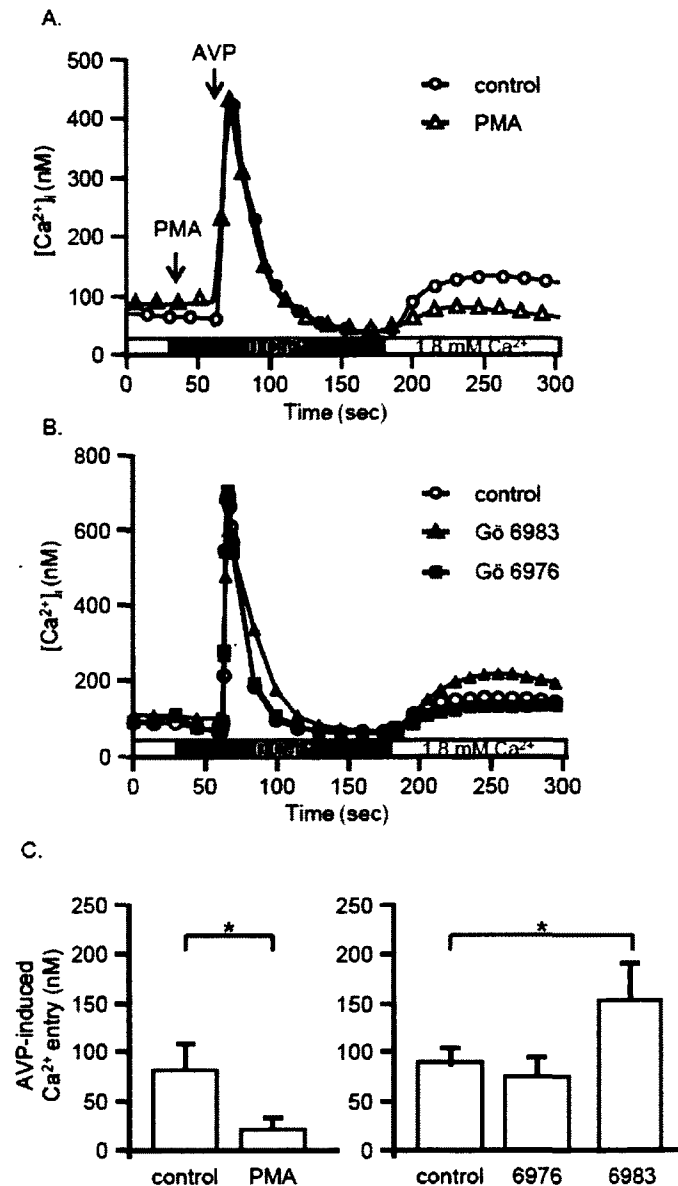


Figure 10. AVP-induced Ca^{2+} entry in A7r5 cells is inhibited by PKC. A7r5 cells were incubated in the absence of extracellular Ca^{2+} (in the presence of 0.5 mM EGTA) for 30 s before being stimulated with 100 nM AVP. External Ca^{2+} (1.8 mM) was restored after 180 s. A, Cells were treated with 100 nM PMA (open triangles) or not (open circles) for 30 s before being stimulated. The graphs are the average of 257 to 333 cells from three independent experiments. B, Cells were treated with 200 nM Gö 6983 (filled triangles), Gö 6983 (filled square), or not (open circles) for 30 s before being stimulated. The graphs are the average of 119 to 130 cells from three independent experiments. C, Net Ca^{2+} entry (average of $[Ca^{2+}]_i$ values after 174-177 s subtracted from $[Ca^{2+}]_i$ values after 294-300 s) were calculated and graphed as average \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.03$.

the presence of Gö 6976, AVP-induced net Ca^{2+} entry was similar to that of the control (75.3 \pm 18.3 nM), whereas Gö 6983 potentiated AVP-induced net Ca^{2+} entry (153.3 \pm 38.4 nM). These results suggest that a novel PKC isoform is involved in the inhibition of AVP-induced Ca^{2+} entry in A7r5 cells. The specific role of PKC δ was assessed by transfecting A7r5 cells with PKC δ siRNA. Treatment of cells with 50 nM PKC δ siRNA significantly reduced the expression of PKC δ to 47.0 \pm 4.6% (fig. 11A and B). Nonspecific PKC δ siRNA showed no effect. The consequences of knocking down the expression of PKC δ on AVP-induced Ca^{2+} entry were evaluated using the Ca^{2+} depletion / Ca^{2+} readdition protocol. Figure 11C shows that AVP-induced Ca^{2+} entry was higher in cells knocked down for PKC δ compared to control cells. In cells treated with siCtrl, AVP-induced net Ca^{2+} entry was 122.8 \pm 8.4 nM, whereas in cells treated with siPKC δ , AVP-induced net Ca^{2+} entry was 215.5 \pm 30.8 nM (fig. 11C and D). These results demonstrated that the activity of endogenously expressed TRPC6 in A7r5 cells is modulated by PKC δ as with recombinant TRPC6 expressed in HEK293 cells.

DISCUSSION

PKC plays an important role in cellular functions by regulating many different signaling pathways, including Ca^{2+} entry (36-38). In the present study, we showed that PKC also inhibits the activity of TRPC6. These results are in agreement with those of Shi et al. (39), who showed that ionic currents in HEK293 cells transfected with TRPC6 are inhibited by PKC following the stimulation of the muscarinic receptor. We also observed an inhibitory effect of PKC on TRPC6 activity in cells endogenously expressing TRPC6. Stimulating mesenteric artery myocytes with angiotensin II activates two different types of current (40). One of these currents, which is inhibited by an intracellular application of an anti-TRPC6 antibody, is down-regulated by PKC. In PC12D cells, CCh-induced Ba^{2+} entry is abolished after a siRNA knockdown of TRPC6 (41). CCh-induced Ba^{2+} entry is also inhibited by PKC in these cells. All evidence to date indicates that the activity of TRPC6 is down-regulated by PKC.

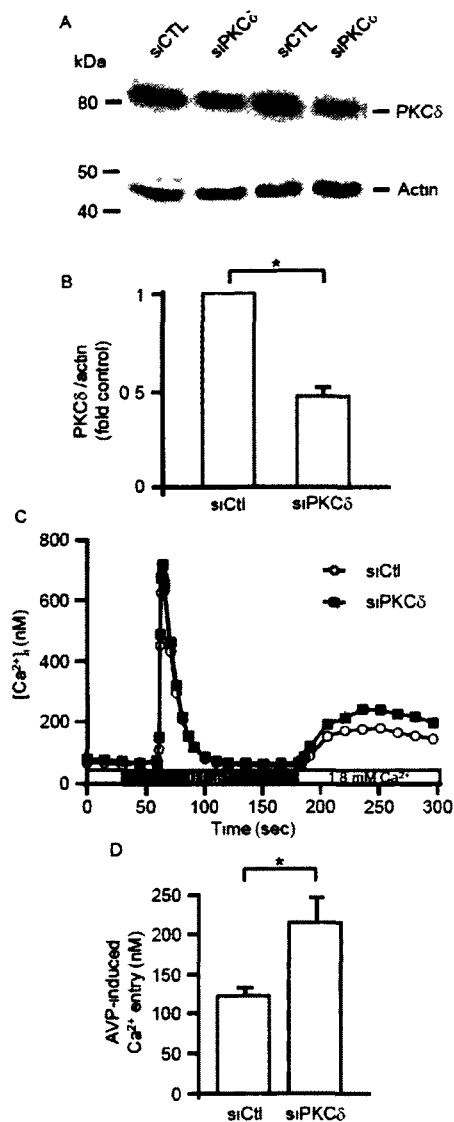


Figure 11. Depletion of PKC δ in A7r5 enhances AVP-induced Ca^{2+} entry. A7r5 cells were transfected with 50 nM of siRNA specific for PKC δ (*siPKC δ*) or universal negative control (*siCTL*). **A**, After 48 h of transfection, cells were solubilized and the quantity of PKC δ (upper panel) or actin (lower panel) in the lysates was determined by Western blot. **B**, The densitometric analysis of PKC δ expression in control or PKC δ -depleted cells is with respect to the control condition. The histogram represents the average \pm SD of three independent experiments done in duplicate. **C**, A7r5 cells were transfected with siRNA specific for PKC δ (filled square) or universal negative control (open circles). After 48 h of transfection, fura-2-loaded transfected cells were incubated in the absence of extracellular Ca^{2+} (in the presence of 0.5 mM EGTA) for 30 s and then stimulated with 100 nM AVP. External Ca^{2+} (1.8 mM) was restored after 180 s. **D**, The net Ca^{2+} entry was calculated by subtracting the value of $[Ca^{2+}]_i$, determined by the average of three values taken just before adding 1.8 mM extracellular Ca^{2+} , from the average of three values of $[Ca^{2+}]_i$, taken 57-63 s after the addition of extracellular Ca^{2+} . The results represent the mean \pm S.D. of 120 to 137 cells from 3 independent experiments. * $P < 0.02$.

In this study, we also showed that inhibition of PKC slightly increases the CCh-induced Ca^{2+} entry in HEK293 cells. HEK293 cells endogenously express TRPC1 and TRPC3 (21,42). Previous studies have shown that PKC enhances the activity of TRPC1 (40,43,44) and inhibits the activity of TRPC3 (13,45,46), as well as TRPC4 (45), and TRPC5 (45,47).

Also, PKC negatively regulates the activity of Orail (48). Therefore, the effects observed with the mock-transfected cells could result from an assortment of PKC-induced inhibition and activation of channels activity.

We showed that TRPC6 expressed in HEK 293 cells is slightly phosphorylated under basal conditions and that the level of phosphorylation is increased by CCh. The CCh-induced TRPC6 phosphorylation was prevented by GF1, a specific PKC inhibitor. It has previously been shown that Ser⁷¹² in human TRPC3 is phosphorylated by PKC and that phosphorylation causes a loss of channel activity (13). For mouse TRPC6, the equivalent residue is Ser⁷⁶⁸. We showed that the activity of TRPC6^{S768A} is similar to that of wild-type TRPC6, and that activity increased following the inhibition of PKC. Mutations of nine putative consensus phosphorylation sites for PKC (S/T-X-R/K) in TRPC6 revealed that none of them is involved in PKC-mediated inhibition of TRPC6. The phosphorylation prediction software, GPS 2.1, identifies four putative phosphorylation sites for PKC δ . One of the potential phosphorylation sites, Ser⁴⁴⁸, was in a sequence that was favorable for phosphorylation by PKC δ . An oriented peptide library was used to show that the optimal sequence for phosphorylation by PKC δ contains a Phe at position P+1 and hydrophobic residues at P+4 and P+5. In addition, basic residues at P+2, P+3, and P+4 are not favorable for phosphorylation (49,50). The sequence surrounding Ser⁴⁴⁸ of TRPC6 contains Phe at P+1, Thr at P+2, Ile at P+3, Phe at P+4, and Leu at P+5, which corresponds to the criterion for PKC δ phosphorylation. As expected, after being stimulated with CCh, mutant TRPC6^{S448A} displayed greater activity than wild-type TRPC6. Moreover, GF1 did not potentiate CCh-induced Ba^{2+} or Ca^{2+} entry into cells expressing TRPC6^{S448A}. More importantly, PMA did not increase the level of phosphorylation of TRPC6^{S448A}. All these results suggested that Ser⁴⁴⁸ is phosphorylated

by a non-conventional PKC. Further studies are needed to determine the involvement of PKC δ or other isoforms of PKC in the phosphorylation of TRPC6. Kim and Saffen (51) previously showed that, in PC12D cells, PKC phosphorylates TRPC6 on Ser⁷⁶⁸. In PC12D cells, TRPC6 forms a multiprotein complex that includes PKC α . However, the functional consequence of phosphorylating Ser⁷⁶⁸ on TRPC6 by PKC had not yet been investigated. The results of all these studies suggest that TRPC6 can be phosphorylated on at least two distinct sites, depending on which isoform of PKC is activated and on the cellular context.

In A7r5 cells, TRPC6 is a major component in the AVP-induced cation current (33,52,53). We showed that, in A7r5 cells, Gö 6983 strongly potentiated AVP-induced Ca²⁺ entry, whereas Gö 6976, which is inactive on novel PKC isoforms, did not potentiate AVP-induced Ca²⁺ entry. Furthermore, PMA nearly abolishes Ca²⁺ entry. This effect of PMA has also been reported by Soboloff *et al.*, who used OAG to activate TRPC6 (32). Also, it has been shown that in smooth muscle cells from rat intrapulmonary arteries, sphingosylphosphorylcholine potentiated the contractile responses induced by prostaglandin F_{2 α} and U436619. This potentiation, which is attributed to enhancement of Ca²⁺ entry, was abolished by the broad spectrum PKC inhibitor Ro-31-8220, but not by Gö 6976 (54). Finally, it was observed that in PKC δ -deficient mast cells, a cells type expressing TRPC6 (55,56), the intracellular Ca²⁺ concentration is elevated (57). Thus, all these results, which were obtained with recombinant cell models and cell models endogenously expressing TRPC6, suggest that PKC δ plays a major role in regulating Ca²⁺ entry.

In summary, our study demonstrated that PKC inhibits TRPC6 activity by phosphorylation of Ser⁴⁴⁸. Since both PKC and TRPC6 are activated following GqPCR signaling, PKC likely operates a negative feedback mechanism on TRPC6 activity to weaken Ca²⁺ entry.

REFERENCES

1. Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**, 11-21
2. Winn, M., Conlon, P., Lynn, K., Farrington, M., Creazzo, T., Hawkins, A., Daskalakis, N., Kwan, S., Ebersviller, S., Burchette, J., Pericak-Vance, M., Howell, D., Vance, J., and Rosenberg, P. (2005) *Science* **308**, 1801-1804
3. Reiser, J., Polu, K., Möller, C., Kenlan, P., Altintas, M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., McGee, M., Sugimoto, H., Brown, D., Kalluri, R., Mundel, P., Smith, P., Clapham, D., and Pollak, M. (2005) *Nat Genet* **37**, 739-744
4. Yu, Y., Fantozzi, L., Remillard, C. V., Landsberg, J. W., Kunichika, N., Platoshyn, O., Tigno, D. D., Thistlethwaite, P. A., Rubin, L. J., and Yuan, J. X. J. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13861-13866
5. Yu, Y., Keller, S., Remillard, C., Safrina, O., Nicholson, A., Zhang, S., Jiang, W., Vangala, N., Landsberg, J., Wang, J., Thistlethwaite, P., Channick, R., Robbins, I., Loyd, J., Ghofrani, H., Grimminger, F., Schermuly, R., Cahalan, M., Rubin, L., and Yuan, J. (2009) *Circulation* **119**, 2313-2322
6. El Boustany, C., Bidaux, G., Enfissi, A., Delcourt, P., Prevarskaya, N., and Capiod, T. (2008) *Hepatology* **47**, 2068-2077
7. Wang, Y., Deng, X., Hewavitharana, T., Soboloff, J., and Gill, D. (2008) *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**, 1127-1133
8. Liao, Y., Plummer, N., George, M., Abramowitz, J., Zhu, M., and Birnbaumer, L. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3202-3206
9. Arguin, G., Regimbald-Dumas, Y., Fregeau, M., Caron, A., and Guillemette, G. (2007) *J Endocrinol* **192**, 659-668
10. Caron, A., Chaloux, B., Arguin, G., and Guillemette, G. (2007) *Cell Calcium* **42**, 323-331
11. Kamp, T., and Hell, J. (2000) *Circ Res* **87**, 1095-1102
12. van Rossum, D., and Patterson, R. (2009) *Cell Calcium* **45**, 535-545
13. Trebak, M., Hempel, N., Wedel, B. J., Smyth, J. T., Bird, G. S., and Putney, J. W. (2005) *Molecular Pharmacology* **67**, 558-563
14. Takahashi, S., Lin, H., Geshi, N., Mori, Y., Kawarabayashi, Y., Takami, N., Mori, M., Honda, A., and Inoue, R. (2008) *J Physiol* **586**, 4209-4223

15. Koitabashi, N., Aiba, T., Hesketh, G., Rowell, J., Zhang, M., Takimoto, E., Tomaselli, G., and Kass, D. (2010) *J Mol Cell Cardiol* **48**, 713-724
16. Nishida, M., Watanabe, K., Sato, Y., Nakaya, M., Kitajima, N., Ide, T., Inoue, R., and Kurose, H. (2010) *J Biol Chem* **285**, 13244-13253
17. Kinoshita, H., Kuwahara, K., Nishida, M., Jiang, Z., Rong, X., Kiyonaka, S., Kuwabara, Y., Kurose, H., Inoue, R., Mori, Y., Li, Y., Nakagawa, Y., Usami, S., Fujiwara, M., Yamada, Y., Minami, T., Ueshima, K., and Nakao, K. (2010) *Circ Res*
18. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. ed., Cold Spring Harbor, New York
19. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (2002) *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York
20. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. (1977) *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467
21. Zhu, X., Jiang, M. S., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1996) *Cell* **85**, 661-671
22. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. (1985) *Journal of Biological Chemistry* **260**, 3440-3450
23. Boulay, G., Zhu, X., Peyton, M., Jiang, M. S., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1997) *Journal of Biological Chemistry* **272**, 29672-29680
24. Boulay, G. (2002) *Cell Calcium* **32**, 201-207
25. Lussier, M. P., Cayouette, S., Lepage, P. K., Bernier, C. L., Francoeur, N., St Hilaire, M., Pinard, M., and Boulay, G. (2005) *Journal of Biological Chemistry* **280**, 19393-19400
26. Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999) *Nature* **397**, 259-263
27. Basora, N., Boulay, G., Bilodeau, L., Rousseau, E., and Payet, M. D. (2003) *Journal of Biological Chemistry* **278**, 31709-31716
28. Estacion, M., Li, S., Sinkins, W. G., Gosling, M., Bahra, P., Poll, C., Westwick, J., and Schilling, W. P. (2004) *Journal of Biological Chemistry* **279**, 22047-22056
29. Schilling, W., Rajan, L., and Strobl-Jager, E. (1989) *J Biol Chem* **264**, 12838-12848
30. Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L., and Yao, X. (2008) *Mol Cell Proteomics* **7**, 1598-1608

31. Jung, S., Strotmann, R., Schultz, N., and Plant, T. D. (2002) *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **282**, C347-C359
32. Soboloff, J., Spassova, M., Xu, W., He, L. P., Cuesta, N., and Gill, D. L. (2005) *Journal of Biological Chemistry* **280**, 39786-39794
33. Mani, B., Brueggemann, L., Cribbs, L., and Byron, K. (2009) *Cell Calcium* **45**, 400-411
34. Gschwendt, M., Dieterich, S., Rennecke, J., Kittstein, W., Mueller, H., and Johannes, F. (1996) *FEBS Lett* **392**, 77-80
35. Martiny-Baron, G., Kazanietz, M., Mischak, H., Blumberg, P., Kochs, G., Hug, H., Marmé, D., and Schächtele, C. (1993) *J Biol Chem* **268**, 9194-9197
36. Nishizuka, Y. (1995) *Faseb Journal* **9**, 484-496
37. Newton, A. C. (2010) *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **298**, E395-E402
38. Parekh, A. B., and Penner, R. (1997) *Physiological Reviews* **77**, 901-930
39. Shi, J., Mori, E., Mori, Y., Mori, M., Li, J., Ito, Y., and Inoue, R. (2004) *Journal of Physiology-London* **561**, 415-432
40. Saleh, S., Albert, A., Peppiatt, C., and Large, W. (2006) *J Physiol* **577**, 479-495
41. Zhang, L., Guo, F., Kim, J., and Saffen, D. (2006) *J Biochem* **139**, 459-470
42. Zhu, X., Chu, P. B., Peyton, M., and Birnbaumer, L. (1995) *Febs Letters* **373**, 193-198
43. Rey, O., Young, S., Papazyan, R., Shapiro, M., and Rozengurt, E. (2006) *J Biol Chem* **281**, 38730-38737
44. Saleh, S., Albert, A., and Large, W. (2009) *J Physiol* **587**, 531-540
45. Venkatachalam, K., Zheng, F., and Gill, D. (2003) *J Biol Chem* **278**, 29031-29040
46. Kwan, H., Huang, Y., and Yao, X. (2006) *J Cell Physiol* **207**, 315-321
47. Zhu, M., Chae, M., Kim, H., Lee, Y., Kim, M., Jin, N., Yang, D., So, I., and Kim, K. (2005) *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C591-600
48. Kawasaki, T., Ueyama, T., Lange, I., Feske, S., and Saito, N. (2010) *J Biol Chem* **285**, 25720-25730
49. Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F., Songyang, Z., and Cantley, L. (1997) *J Biol Chem* **272**, 952-960
50. Fujii, K., Zhu, G., Liu, Y., Hallam, J., Chen, L., Herrero, J., and Shaw, S. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13744-13749

51. Kim, J. Y., and Saffen, D. (2005) *Journal of Biological Chemistry* **280**, 32035-32047
52. Li, M., Zacharia, J., Sun, X., and Wier, W. *Pharmacol Res* **58**, 308-315
53. Maruyama, Y., Nakanishi, Y., Walsh, E., Wilson, D., Welsh, D., and Cole, W. (2006) *Circ Res* **98**, 1520-1527
54. Snetkov, V., Thomas, G., Teague, B., Leach, R., Shaifta, Y., Knock, G., Aaronson, P., and Ward, J. (2008) *Hypertension* **51**, 239-245
55. Sanchez-Miranda, E., Ibarra-Sanchez, A., and Gonzalez-Espinosa, C. (2010) *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 1714-1720
56. Sel, S., Rost, B., Yildirim, A., Sel, B., Kalwa, H., Fehrenbach, H., Renz, H., Gudermann, T., and Dietrich, A. (2008) *Clin Exp Allergy* **38**, 1548-1558
57. Leitges, M., Gimborn, K., Elis, W., Kalesnikoff, J., Hughes, M., Krystal, G., and Huber, M. (2002) *Mol Cell Biol* **22**, 3970-3980

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Quebec Heart & Stroke Foundation. G.B. is the recipient of a scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec. We thank Drs. Gaétan Guillemette and Emanuel Escher, Université de Sherbrooke, for the HEK293 cells expressing the angiotensin II receptor type 1. This work is part of S.M.B.'s PhD thesis at Université de Sherbrooke.

The abbreviations used are: CCh, carbachol; PMA, phorbol myristate acetate; GPCR, G-protein coupled receptor; HEK293, human embryonic kidney cell clone 293; $[Ca^{2+}]_i$, intracellular concentration of Ca^{2+} ; OAG, 1-oleyl-2-acetyl-sn-glycerol; GF1, bisindolylmaleimide I; AVP, vasopressin; SOCE, store-operated Ca^{2+} entry; ROCE, receptor-operated Ca^{2+} entry.

amino acid	sequence	location
Ser04	SQSPR	N-terminus
Thr09	FVTRR	N-terminus
Ser14	GGSLK	N-terminus
Thr23	AGTRR	N-terminus
Ser55	YPSFR	N-terminus
Thr64	RLTHR	N-terminus
Ser258	ECSQK	N-terminus, between 4 th ARD and CC
Thr629	GRTVK	2 nd intracellular loop
Ser768	VPSPK	C-terminus, putative IP ₃ R interaction region
Ser835	QSSTR	C-terminus
Ser892	ISSLR	C-terminus CC
Ser928	EESRR	C-terminus

Bousquet *et al.*, Supplementary Table 1

Supplementary Table 1. List of all canonical PKC phosphorylation sites on TRPC6 sequence.

amino acid	sequence	location
Ser28	NESQD	N-terminus
Thr69	RQTIL	N-terminus
Ser321	KLSMQ	N-terminus coiled-coil
Ser448	AASFT	N-terminus

Bousquet *et al.*, Supplementary Table 2

Supplementary Table 2. GPS2.1 generated PKC δ putative targets on TRPC6 sequence.

ARTICLE #2 – AVANT-PROPOS

Basal phosphorylation of TRPC6 on serine 814.

Auteurs : Simon M. Bousquet et Guylain Boulay

Statut : Soumis à *Journal of Cellular Biochemistry*, le 22 octobre 2010.

Avant-propos :

J'ai effectué toutes les expériences, ainsi que l'analyse de tous les résultats présentés. J'ai participé à l'écriture et à la préparation du manuscrit.

Cité comme : Bousquet et Boulay, 2010.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE #2

Les TRPC sont des canaux cationiques impliqués dans l'entrée de calcium. Leur régulation par phosphorylation module leur routage et leur activité. L'activité de TRPC6 augmente suite à sa phosphorylation par Fyn, et est inhibée par la PKG et la PKC. Une précédente étude de notre laboratoire a montré que TRPC6 est phosphorylé dans les cellules HEK293 en conditions non stimulées. Afin d'investiguer le mécanisme responsable de cette phosphorylation, nous avons utilisé une approche de spectrométrie de masse combinée au marquage métabolique et avons découvert que la sérine en position 814 de TRPC6 est phosphorylée dans des cellules non stimulées. La mutation de la Ser⁸¹⁴ en Ala n'affecte pas l'activité de TRPC6. Bien que la Ser⁸¹⁴ fasse partie d'un site consensus pour la CK2 (caséine kinase 2), nous démontrons que la CK2 n'est pas impliquée dans la phosphorylation de TRPC6 ou la régulation de son activité. En résumé, nous avons identifié un nouveau site de phosphorylation basale (Ser⁸¹⁴) sur TRPC6 et démontrons que la CK2 n'est pas responsable de la phosphorylation de ce site.

ABSTRACT

TRPC are nonselective cation channels involved in calcium entry. Their regulation by phosphorylation has been shown to modulate their routing and activity. TRPC6 activity increases following phosphorylation by Fyn, and is inhibited by PKG and PKC. A previous study by our group showed that TRPC6 is phosphorylated under unstimulated conditions in HEK293 cells. To investigate the mechanism responsible for this phosphorylation, we used a MS/MS approach combined with metabolic labeling and discovered that the serine at position 814 of TRPC6 was phosphorylated in unstimulated cells. The mutation of Ser⁸¹⁴ into Ala did not change TRPC6 activity. Even though Ser⁸¹⁴ is within a consensus site for CK2, we showed that CK2 is not involved in the phosphorylation of TRPC6 or the regulation of its activity. In summary, we identified a new basal phosphorylation site (Ser⁸¹⁴) on TRPC6 and showed that CK2 is not responsible for the phosphorylation of this site.

INTRODUCTION

Calcium homeostasis is crucial for every cell type, and its tight regulation allows intracellular calcium to be a widely used second messenger [Berridge et al., 2000]. This regulation is a fine balance between calcium entry from the extracellular medium, release from intracellular stores, and extrusion through the activity of pumps or exchangers. TRP (transient receptor potentials) are plasma membrane-embedded calcium channels that were first discovered in *Drosophila melanogaster*. Up to 28 mammalian isoforms of dTRP have been cloned so far and have been distributed into six subfamilies (TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPML, and TRPA) [Nilius et al., 2007]. TRPCs are the closest subfamily to dTRP and include seven members (TRPC1 to TRPC7). Their role as calcium channels has been well characterized, but their exact activation and regulation mechanisms have yet to be fully understood. Along with STIM and Orai, TRPCs are involved in store-operated and receptor-operated calcium entry following hormonal stimulation of GqPCR or RTK [Liao et al., 2007]. These receptors activate phospholipase C β or phospholipase C γ , which hydrolyze phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate into

diacylglycerol and inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃). IP₃ activates its receptor (IP₃R) on the endoplasmic reticulum to induce calcium release. Store depletion and diacylglycerol formation activate channels located at the plasma membrane to induce Ca²⁺ entry as long as the stimulation is maintained. TRPC6 is one of these Ca²⁺ entry channels [Boulay et al., 1997]. A dysregulation of TRPC6 has been associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension [Yu et al., 2004; Yu et al., 2009], focal segmental glomerulosclerosis [Reiser et al., 2005; Winn et al., 2005], and hyperproliferation of cancer cells [El Boustany et al., 2008]. Understanding the mechanisms regulating TRPC6 activity and routing is thus essential to better treat or prevent these pathologies.

Post-translational modification of TRPCs has been shown to influence their activity and routing. Following EGFR activation, TRPC6 is phosphorylated by Fyn, a Src family protein tyrosine kinase. Phosphorylation by Fyn allows optimal activation of TRPC6 [Hisatsune et al., 2004]. PKG phosphorylates TRPC6 on Thr⁶⁹, thus decreasing its channel activity [Takahashi et al., 2008]. PKC phosphorylates TRPC6 on Ser⁷⁶⁸ [Kim and Saffen, 2005] and Ser⁴⁴⁸ [Bousquet et al., 2010]. We have shown that PKC-dependent phosphorylation of TRPC6 on Ser⁴⁴⁸ decreases its activity and that TRPC6 is phosphorylated under basal conditions [Bousquet et al., 2010]. The purpose of the present study was to investigate the mechanism responsible for this basal phosphorylation of TRPC6. Using a mass spectrometry approach, we identified three peptides in TRPC6 that are phosphorylated under basal conditions. Among these sites, Ser⁸¹⁴ contributed to 50% of the basal phosphorylation state of TRPC6. Surprisingly, mutant TRPC6^{S814A} displayed activity similar to that of wild-type TRPC6. As Ser⁸¹⁴ is within a consensus sequence for phosphorylation by casein kinase II (CK2), we used two CK2 inhibitors to investigate the possible involvement of this kinase. However, the inhibition of CK2 did not modify the phosphorylation state or activity of TRPC6. Thus, we had identified a new phosphorylation site on TRPC6.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Material

Cell culture media, serum, Hepes, trypsin, Opti-MEM I, LipofectAMINE 2000, and Zero Blunt Topo PCR cloning kits were purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Phosphate-free culture media and G418 were from Wisent (St-Bruno, QC, Canada). NP-40 was from Roche (Laval, QC, Canada). DMAT, TBCA, carbachol, arginine vasopressin, phosphatase cocktail inhibitor set #2, and fura 2/AM were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Rabbit polyclonal and mouse monoclonal anti-hemagglutinin (HA)-specific antibodies were from Covance (Berkeley, CA, USA). Peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibodies, peroxidase-conjugated sheep anti-mouse antibodies, protein A-sepharose CL-4B, and Biomax MR films were from GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC, Canada). Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, 0.2 µm nitrocellulose membranes, and ³²P-orthophosphoric acid were from Perkin-Elmer Life Sciences (Woodbridge, ON, Canada). All primers and oligonucleotides were from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Phusion High-Fidelity DNA polymerase was from Finnzymes (Espoo, Finland). Restriction enzymes, PNGase F, and T4 DNA ligase were from New England Biolabs (Pickering, ON, Canada). Unless otherwise stated, all other reagents were from Sigma (Oakville, ON, Canada) or Laboratoire MAT (Quebec City, QC, Canada).

Mass spectrometry

Protein in-gel digestion- Excised acrylamide bands containing immunoprecipitated and separated TRPC6 were sent to the Proteomics Platform of the Eastern Quebec Genomics Center (CHUL Research Center, Quebec City, QC, Canada) for tandem mass spectrometry analysis. Proteins were extracted from gels, placed in 96-well plates, and washed with water. Tryptic digestion was performed using a MassPrep liquid handling robot (Waters, Milford, USA) according to the manufacturer's specifications and the protocol of Shevchenko *et al.* [Shevchenko *et al.*, 1996] with the modifications suggested by Havlis *et al* [Havlis *et al.*, 2003]. Briefly, proteins were reduced with 10 mM DTT and

alkylated with 55 mM iodoacetamide. The trypsin digestion was performed using 105 mM modified porcine trypsin (sequencing grade, Promega, Madison, WI, USA) at 58°C for 1 h. Digestion products were extracted using 1% formic acid and 2% acetonitrile followed by 1% formic acid and 50% acetonitrile. The recovered extracts were pooled, vacuum centrifuge dried, resuspended in 8 µl of 0.1% formic acid, and 2 µl was analyzed by mass spectrometry.

Mass spectrometry- Peptide samples were separated by online reversed-phase nanoscale capillary liquid chromatography and analyzed by electrospray mass spectrometry (MS/MS). The experiments were performed using a Thermo Surveyor MS pump connected to a LTQ linear ion trap mass spectrometer (ThermoFisher, San Jose, CA, USA) equipped with a nanoelectrospray ion source (ThermoFisher). The peptides were separated on a PicoFrit column (BioBasic C18, 10 cm x 0.075 mm internal diameter, New Objective, Woburn, MA, USA) with a 2-50% linear gradient of solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) for 30 min at a flow rate of 200 nL/min (obtained by flow-splitting). Mass spectra were acquired using a data dependent acquisition mode using Xcalibur software version 2.0. Each full scan mass spectrum (400 to 2000 m/z) was followed by collision-induced dissociation of the seven most intense ions. The dynamic exclusion (30 s exclusion duration) function was enabled, and the relative collisional fragmentation energy was set at 35%. All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.2.0) set up to search for the sequence of mouse TRPC6 assuming trypsin as the digestion enzyme. Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.50 Da and a parent ion tolerance of 2.0 Da. The iodoacetamide derivative of cysteine was specified as a fixed modification, and the oxidation of methionine and the phosphorylation of serine, threonine, and tyrosine were specified as variable modifications. Four missed cleavages were allowed.

Criteria for protein identification- Scaffold (version 2.00.05, Proteome Software Inc., Portland, OR, USA) was used to validate MS/MS-based peptide and protein

identifications. Peptide identifications were accepted if they exceeded 95% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm [Keller et al., 2002]. Protein identifications were accepted if they exceeded 95% probability and contained at least two identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm [Nesvizhskii et al., 2003]. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on the MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. For phosphopeptides, a pronounced neutral loss of phosphoric acid from the precursor ion and/or fragment ions was required as well as extensive coverage of the b and y series. In addition, the phosphopeptide spectra were submitted to Ascore to identify the phosphorylation site(s) on the peptide. Ascore measures the probability of correct phosphorylation site localization based on the presence and intensity of site-determining ions in MS/MS spectra [Beausoleil et al., 2006].

Molecular biology

Standard molecular biology techniques were used to isolate, analyze, and clone DNA [Ausubel et al., 2002; Sambrook and Russell, 2001]. Point mutations in mouse TRPC6 were introduced using a PCR-based site-directed mutagenesis approach. The PCR fragments were subcloned and amplified in the pCR-BluntII-TOPO vector using a Zero Blunt TOPO PCR cloning kit. The fragments were sequenced and reinserted into hemagglutinin (HA)-tagged TRPC6 in pcDNA3.1 using the appropriate restriction enzymes and T4 DNA ligase. All constructs were confirmed by sequencing from double-stranded DNA templates using the dideoxynucleotide termination method [Sanger et al., 1977].

Cell culture and transfection

HEK293T cells and A7r5 vascular myocytes were maintained at subconfluence in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 U/ml of penicillin, and 50 µg/ml of streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. T6.11 cells (HEK293 stably transfected with mouse TRPC6) were cultured in the same medium

supplemented with 400 µg/ml G418. For transient transfections, six-well plates were treated with 0.1 mg/ml poly-L-lysine for 30 min, rinsed with PBS (137 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4), and air-dried. Plasmid DNA (1 µg) in 250 µL Opti-MEM I was placed in each well, to which 2.5 µL of LipofectAMINE 2000 diluted in 250 µl of Opti-MEM I was added and thoroughly mixed. After a 20 min incubation, 8×10^5 HEK293T cells diluted in 1.5 ml of culture medium without antibiotics were added to each well. The cells were incubated for 16 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Twenty-four hours after the transfection, the cells from one well were transferred into a 60-mm Petri dish for metabolic labeling assays or deposited on three poly-L-lysine-treated coverslips for $[Ca^{2+}]_i$ measurements.

Metabolic labeling

Stably or transiently transfected cells grown in 60 mm Petri dishes were washed once with phosphate-free DMEM and incubated for 4 h in phosphate-free DMEM supplemented with 250 µCi/ml of ³²P-inorganic phosphate. The cells were then washed twice on ice with ice-cold PBS-EDTA (137 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1 mM EDTA, 17.4 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM NaH₂PO₄) prior to being lysed.

Immunoprecipitation and protein separation

The cells were lysed with 1 ml of ice-cold lysis buffer (1.25% NP-40, 1.25% sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 12.5 mM sodium phosphate, pH 7.2, 1 µg/ml of soybean trypsin inhibitor, 5 µg/ml of leupeptin, 100 µM phenylmethylsulfonyl fluoride) supplemented with a phosphatase inhibitor cocktail for 30 min on ice with gentle agitation. They were then scraped from the surface of the Petri dish and centrifuged at 15 000 x g for 15 min at 4°C. The supernatant was collected and immunoprecipitated with 50 µl of protein A-sepharose beads (50% slurry) and anti-HA rabbit antibody (1:1000) for 2 h at 4°C. The samples were then centrifuged for 1 min at 4°C at 800 x g and washed twice with 500 µl of ice-cold lysis buffer. Immunoprecipitated proteins were dissolved in 40 µl of 2X Laemmli buffer and boiled for 5 min before being separated on 8% SDS-

polyacrylamide gels. The gels were then either stained, dried, and exposed to a film for autoradiography, or the protein bands were transferred onto a 0.2 μ m nitrocellulose membrane (400 mA for 2 h or 100 mA overnight in 150 mM glycine, 20 mM Tris-base, 20% methanol) for immunoblotting. For MS/MS analyses, stained bands corresponding to TRPC6 were excised.

Immunoblots

The nitrocellulose membranes to which the whole cell lysates and immunoprecipitated proteins had been transferred were stained with Ponceau S (0.1% in 5% acetic acid) to visualize the marker proteins, destained in TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and blocked in TBST containing 5% (w/v) nonfat dry milk for either 1 h at room temperature or overnight at 4°C. The membranes were then washed and incubated in TBST for 2.5 h at room temperature or overnight at 4°C with specific primary antibodies (mouse anti-HA 1:1000). After three washes with TBST, the membranes were incubated for 1.5 h at room temperature with TBST containing 1:10 000 peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG. The blots were washed three times with TBST, and the immune complexes were detected with a Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus kit using the manufacturer's protocol.

Measurement of $[Ca^{2+}]_i$

We used the method described by Zhu *et al.* [Zhu et al., 1996] to measure $[Ca^{2+}]_i$. Briefly, T6.11, A7r5, or transfected HEK293T cells grown on poly-L-lysine-treated coverslips were washed twice with HBSS (120 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 0.8 mM $MgSO_4$, 10 mM glucose, 1.8 mM $CaCl_2$, 20 mM Hepes, pH 7.4) and loaded with fura 2/AM (1.5 μ M in HBSS) for 20 min at room temperature in the dark. After washing and de-esterifying in fresh HBSS for 20 min at room temperature, the coverslips were inserted in a circular open-bottom chamber and placed on the stage of a Zeiss Axovert microscope fitted with an Attofluor Digital Imaging and Photometry System (Attofluor Inc., Rockville, MD, USA). Isolated fura 2-loaded cells were selected and their $[Ca^{2+}]_i$ were measured by

fluorescence vidcomicroscopy at room temperature using alternating excitation wavelengths of 334 and 380 nm (10 nm bandpass filters). Emitted fluorescence was monitored through a 510 nm dichroic mirror and a 520 nm long pass filter set. Free $[Ca^{2+}]_i$ was calculated from the 334/380 fluorescence ratio using the method of Grynkiewicz *et al.* [Grynkiewicz *et al.*, 1985]. Reagents were diluted to their final concentrations in HBSS and applied to the cells by surface perfusion. Ca^{2+} -free HBSS was supplemented with 0.5 mM EGTA to chelate any remaining extracellular Ca^{2+} . For the transient transfections, cells were co-transfected with cDNA encoding the M5 muscarinic receptor, and only those responding to carbachol (CCh) were analyzed. $[Ca^{2+}]_i$ values were recorded every 3 s.

RESULTS

HEK293 cells stably expressing TRPC6 (HEK293 T6.11) were solubilized, and TRPC6 was immunoprecipitated using an anti-HA antibody and size fractionated by SDS-PAGE. The gel was stained with colloidal Brilliant Blue, and the bands corresponding to TRPC6 (Fig. 1A) were excised and in-gel digested with trypsin. Tryptic fragments were analyzed by LC-MS/MS and identified by database searches using the Mascot search engine. Sequence coverage of TRPC6 totaled 68.1% (77.8% of intracellular regions) ($n = 2$) (Fig. 1A). Nano-LC-MS/MS analyses and MS spectra revealed three major phosphorylated peptides (Fig. 1B). A peptide located in the N-terminus of TRPC6 revealed that Ser¹⁴ was phosphorylated. A second peptide located in the C-terminus revealed that Ser⁸¹⁴ was also phosphorylated. A third peptide, also located in the C-terminus, revealed that either Ser⁹⁰² or Thr⁹⁰⁵ was phosphorylated. Figure 1C shows the MS/MS spectrum of phosho-Ser⁸¹⁴. Figure 1D shows the phosphorylation sites identified, the peptide on which they were identified, and the Ascore for each site.

To determine which of these potential target sites were phosphorylated under unstimulated conditions, we mutated them to alanine. HEK293 cells were transiently transfected with the HA-tagged TRPC6 or mutants and metabolically labeled with

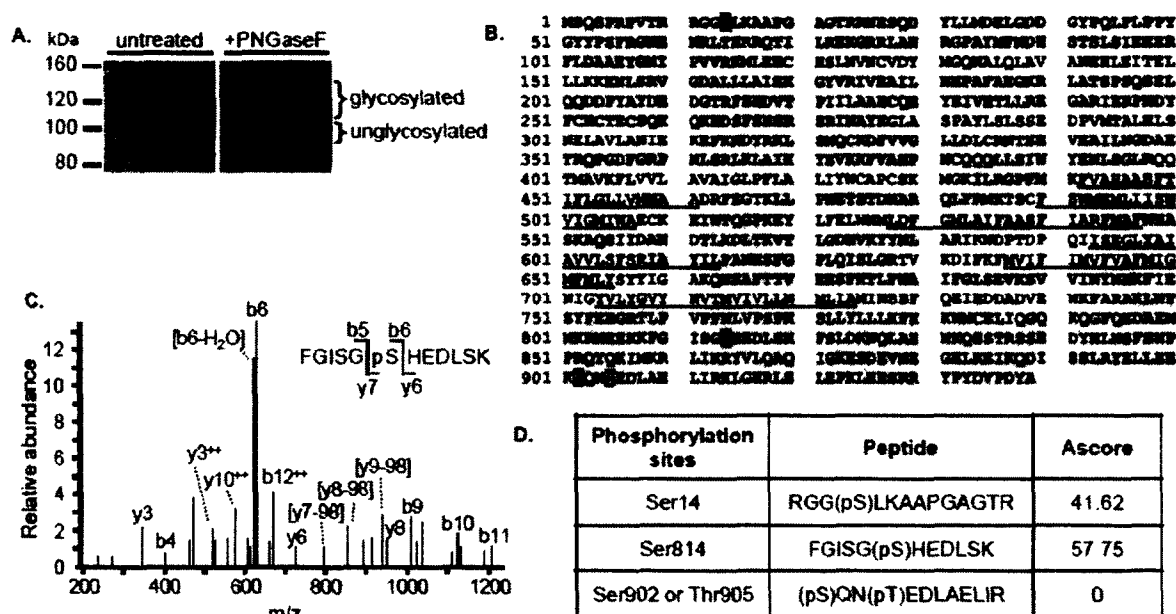


Figure 1. MS/MS identification of potential phosphorylated residues on TRPC6.

A, Untreated T6.11 cells were lysed before TRPC6 was immunoprecipitated using an anti-HA antibody. The immunoprecipitated proteins were then deglycosylated with PNGaseF or not, before being separated by SDS-PAGE. Colloidal Brilliant Blue staining shows that both forms of TRPC6 are present. **B,** Sequence coverage of TRPC6 by nano-LC-MS/MS after tryptic digestion is highlighted. Phosphorylation hits are identified by white characters on a black background. The transmembrane segments are underlined. Residues 931 to 939 represent the HA epitope. Total sequence coverage is 68%. **C,** Simplified LC-MS/MS spectrum of the FGISGpSHEDLSK peptide from TRPC6 phosphorylated at Ser⁸¹⁴. The phosphorylation of Ser⁸¹⁴ was confirmed by the mass assignments of fragmentation ions b5, b6, y6, and y7. **D,** The four TRPC6 putative basal phosphorylations identified by LC-MS/MS analysis and the Ascore for each site are shown. An Ascore of 20 or more means that the phosphorylation is on that particular residue with a probability of 99%, and not on another serine, threonine, or tyrosine that may be present on the peptide. An Ascore of 0 for S902 and T905 means that we could not discriminate the residue on which the phosphorylation occurred.

inorganic ^{32}P . HA-tagged proteins were then immunoprecipitated with an anti-HA antibody and size fractionated by SDS-PAGE. The phosphorylation states of the proteins were revealed by autoradiography. Under basal conditions, the level of phosphorylation of mutant TRPC6^{S814A} corresponded to $52.8 \pm 28.0\%$ of that of WT TRPC6 (Fig. 2A and 2B). However, under basal conditions, the phosphorylation levels of mutants TRPC6^{S14A}, TRPC6^{S902A}, and TRPC6^{T905A} were similar to that of WT TRPC6 (Fig. 2A). Mutations did not alter the overall expression of TRPC6 (Fig. 2A, lower panel). As the substitution of Ser⁸¹⁴ for Ala decreased the basal phosphorylation of TRPC6 by only 50%, these results suggested the existence of a second unknown phosphorylation site on TRPC6. These findings thus demonstrated that the Ser⁸¹⁴ of TRPC6 is phosphorylated under unstimulated conditions.

We next assessed the effect of the phosphorylation of Ser⁸¹⁴ on the activity of TRPC6. HEK293 cells were transiently transfected with the M5 muscarinic receptor and with TRPC6 or its mutant TRPC6^{S814A}. Ca^{2+} entry through TRPC6 was analyzed using the standard Ca^{2+} depletion/restoration protocol [Boulay et al., 1997]. Cells were incubated for 30 s in Ca^{2+} -free medium containing 0.5 mM EGTA before depleting the intracellular Ca^{2+} stores with 5 μM CCh. Once the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ had returned to the basal level (2 min after the addition of CCh), the extracellular medium was replaced with medium containing 1.8 mM CaCl_2 . Figure 3A shows that, in the absence of extracellular Ca^{2+} , CCh-induced Ca^{2+} release was similar in TRPC6-, TRPC6^{S814A}-, and mock-transfected cells. When 1.8 mM CaCl_2 was added to TRPC6- and TRPC6^{S814A}-transfected cells, Ca^{2+} entry raised the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to a plateau level of approximately 250 nM and 260 nM, respectively (Fig. 3A). In mock-transfected cells, Ca^{2+} entry raised the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to a lower plateau level of approximately 210 nM. Figure 3B shows the relative net Ca^{2+} entry, which was calculated by subtracting the basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from the maximal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ recorded after the extracellular Ca^{2+} had been restored. Compared to the endogenous net Ca^{2+} entry in mock-transfected cells, the expression of TRPC6 enhanced CCh-induced net Ca^{2+} entry to $127 \pm 15\%$ ($n = 6$). Expression of TRPC6^{S814A} gave similar results, with an increase of CCh-induced net

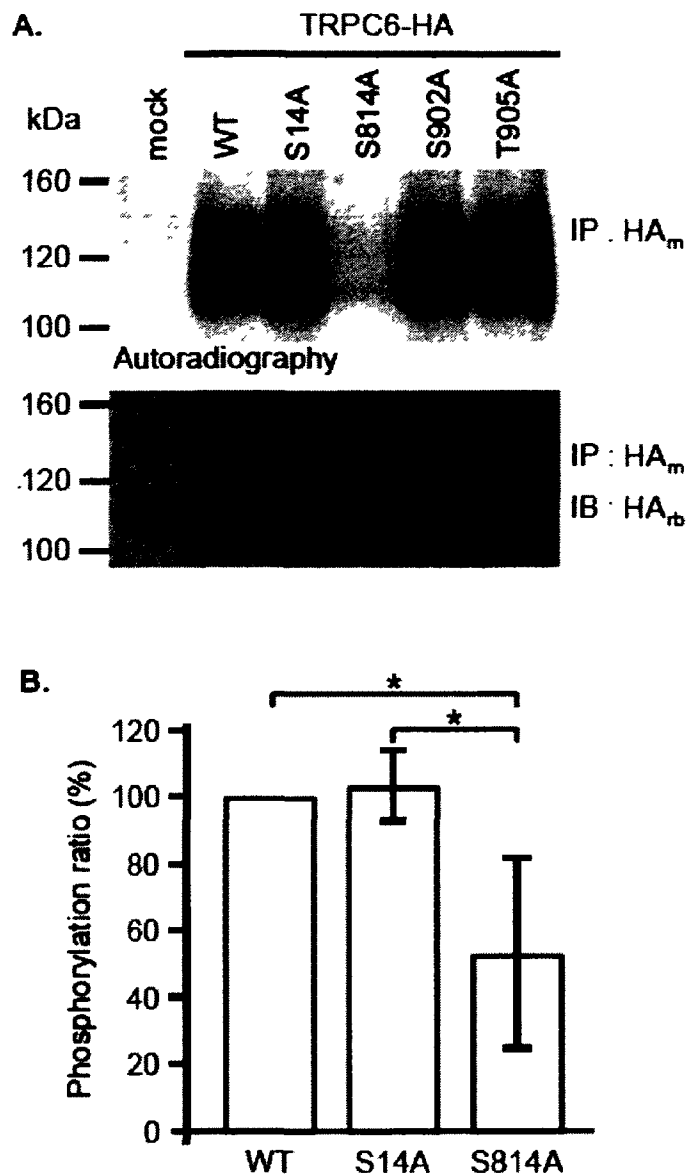


Figure 2. Metabolic labeling of TRPC6 and mutants reveals that Ser814 is phosphorylated. **A**, Metabolic labeling was carried out as described in *Experimental Procedures*. HEK 293T cells transfected with wild-type or mutant TRPC6 were lysed and TRPC6 was immunoprecipitated and separated by SDS-PAGE. The autoradiogram and the immunoblot are representative of three to five independent experiments. **B**, The histogram represents the relative amount of phosphorylated TRPC6 calculated as the ratio of phospho-TRPC6 (densitometric analysis of autoradiograms) to total TRPC6 (determined by scanning and quantifying the immunoblot signals) for each sample. The histogram is the average \pm SD of three to five experiments. * $P < 0.03$

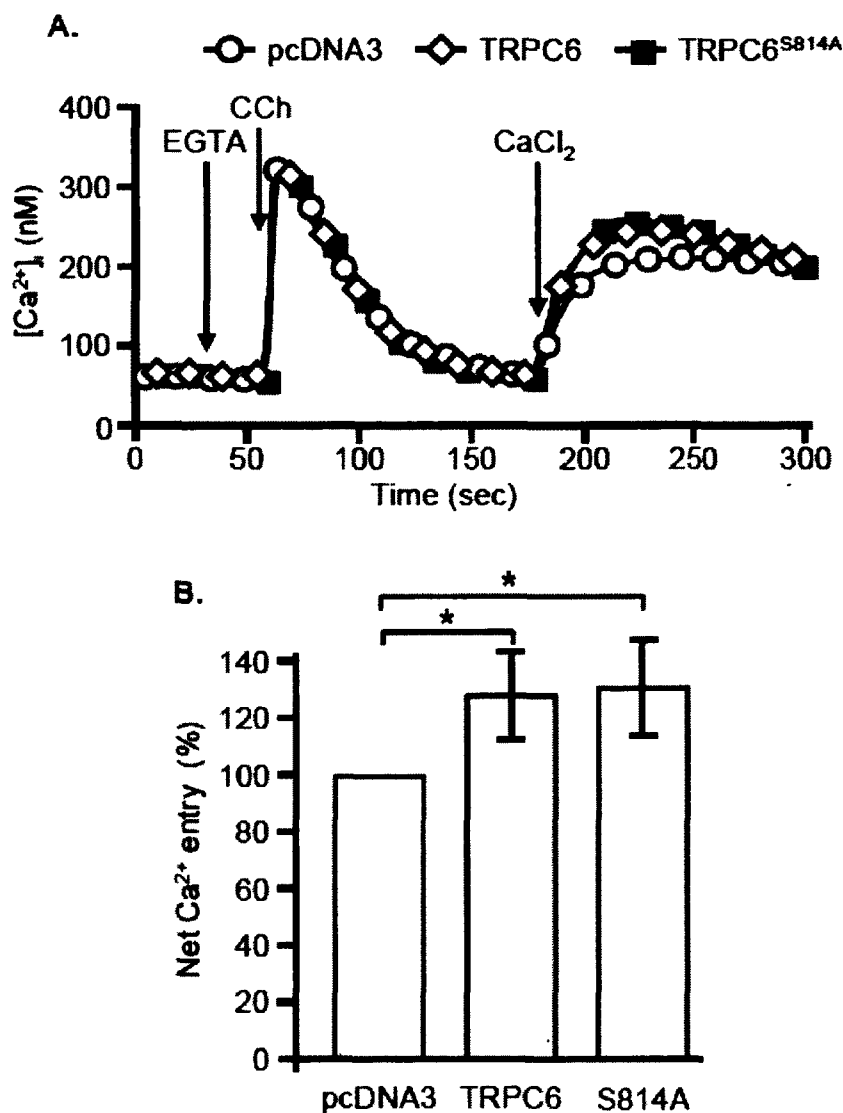


Figure 3. The S814A mutation does not alter TRPC6 activity.

A. $[Ca^{2+}]_i$ was recorded in HEK293T transiently transfected with pcDNA3 (open circles), TRPC6WT (open diamonds), or TRPC6^{S814A} (closed squares). The cells were incubated in the absence of extracellular Ca^{2+} (in the presence of 0.5 mM EGTA) for 30 s before being stimulated with 5 μ M CCh. External Ca^{2+} (1.8 mM) was restored at 180 s. The graphs represent the average of 103 to 165 cells from one representative experiment. **B.** Maximal CCh-induced net Ca^{2+} entry values were calculated by subtracting basal $[Ca^{2+}]_i$ (average of the two values before Ca^{2+} restoration) from the average of the three maximal consecutive $[Ca^{2+}]_i$ values after Ca^{2+} was restored. The histogram represents the average \pm SD of six independent experiments. * $P < 0.01$

Ca^{2+} entry reaching $131 \pm 17\%$ ($n = 6$). These results suggested that the basal phosphorylation of TRPC6 on Ser⁸¹⁴ does not affect channel activity. An analysis of the amino acid sequence surrounding Ser⁸¹⁴ of TRPC6 revealed that this region is a consensus site for CK2 substrate recognition (Ser/Thr-X-X-Glu/Asp) [Meggio et al., 1994]. To verify whether CK2 is responsible for the phosphorylation of Ser⁸¹⁴ of TRPC6 under basal conditions, we used two selective CK2 inhibitors, DMAT (2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole) and TBCA ((E)-3-(2,3,4,5-tetrabromophenyl)acrylic acid). T6.11 cells were metabolically labeled with inorganic ³²P for 4 h in the presence of either 10 μM DMAT or 10 μM TBCA. TRPC6 was then immunoprecipitated with an anti-HA antibody and size fractionated by SDS-PAGE, and its phosphorylation state was revealed by autoradiography. Figure 4A shows that neither DMAT nor TBCA prevented or attenuated the phosphorylation state of TRPC6. The relative phosphorylation of TRPC6 incubated with DMAT and TBCA was $0.95 \pm 0.22\%$ and $1.06 \pm 0.32\%$, respectively, of its phosphorylation state in untreated cells (Fig. 4B).

Despite the fact that CK2 did not directly alter the phosphorylation state of TRPC6, we investigated whether this kinase could have a possible indirect role in Ca^{2+} signaling. In T6.11 cells, an incubation for 4 h with DMAT and TBCA potentiated CCh-induced Ca^{2+} release by approximately 30%. However, after calcium restoration, DMAT and TBCA did not significantly alter CCh-induced Ca^{2+} entry (Fig. 5A). Compared to untreated cells, net CCh-induced Ca^{2+} entry in DMAT-treated cells was $89 \pm 5\%$, whereas it was $99 \pm 11\%$ in TBCA-treated cells. A possible role for CK2 was also investigated in A7r5 cells. These cells endogenously express a high level of TRPC6, and their AVP-induced Ca^{2+} entry is mostly through TRPC6 [Jung et al., 2002; Mani et al., 2009; Soboloff et al., 2005]. In A7r5 cells, a 4 h preincubation with 10 μM DMAT did not modify AVP-induced Ca^{2+} release (data not shown) or AVP-induced Ca^{2+} entry (Fig. 5C). These results thus exclude a role for CK2 in the direct and/or indirect regulation of TRPC6 activity.

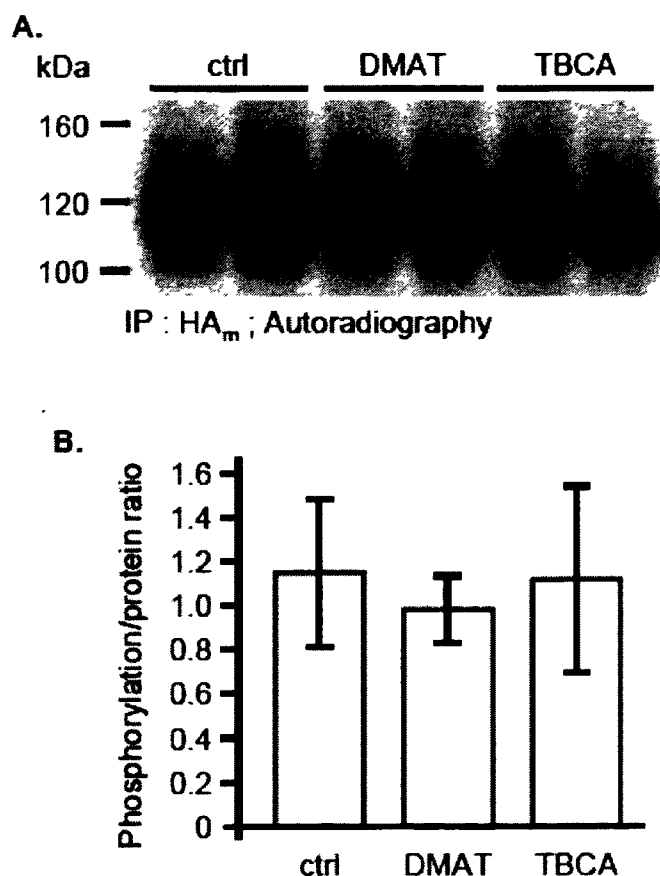


Figure 4. Casein kinase 2 does not phosphorylate TRPC6.

A, T6.11 cells were labeled in the presence or not of 10 μ M DMAT or 10 μ M TBCA for 4 h before the cells were lysed and TRPC6 was immunoprecipitated and separated by SDS-PAGE. The autoradiogram is representative of six independent experiments. **B**, The densitometric analyses of autoradiograms and Western blots (not shown) from **A** and the calculated ratios are relative to the control (100%). The histogram represents the average \pm SD of six independent experiments.

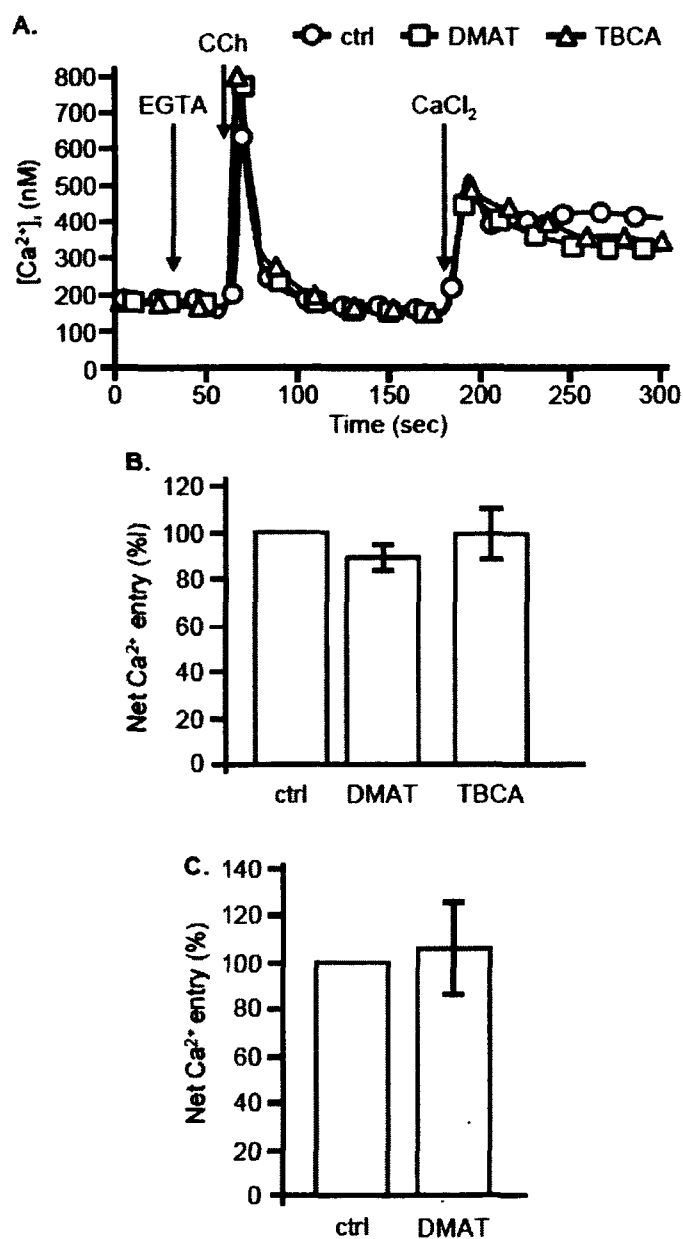


Figure 5. The inhibition of CK2 with specific inhibitors does not alter TRPC6 activity. **A**, Fura-2-loaded T6.11 cells were left untreated (circles) or were treated for 4 h with 10 μ M DMAT (squares) or 10 μ M TBCA (triangles). CCh (5 μ M) induced Ca^{2+} release in the absence of extracellular Ca^{2+} while Ca^{2+} restoration 2 min later induced Ca^{2+} entry. DMAT and TBCA concentrations were maintained during the assay. The graphs are representative of 176 to 227 cells from one typical experiment. **B**, Net maximal Ca^{2+} entries from **A** were calculated as in Figure 3 and are relative to the control (100%). The histogram represents the average \pm SD of four independent experiments. **C**, The same protocol was carried out on A7r5 cells using 100 nM AVP instead of CCh. The net maximal Ca^{2+} entry was calculated relative to the control (100%). The histogram is the average \pm SD of three independent experiments.

DISCUSSION

In a previous study, we observed that TRPC6 stably expressed in HEK293 cells is phosphorylated under unstimulated conditions (Bousquet and Boulay, 2010). Basal phosphorylation of TRPC6 has been observed in resting platelets, but the phosphorylated residue has not been identified [Hassock et al., 2002]. In the present study, we showed that Ser⁸¹⁴ in TRPC6 is phosphorylated under basal conditions. Mutating Ser⁸¹⁴ into alanine (S814A) caused a 50% decrease in the phosphorylation level of TRPC6, suggesting that another residue was also phosphorylated under our unstimulated conditions. Although our mass spectrometry approach suggested that Ser¹⁴ and Ser⁹⁰² or Thr⁹⁰⁵ are also phosphorylated under basal conditions, mutating these residues for Ala did not modify the basal phosphorylation state of TRPC6. Further studies are thus needed to identify the putative second phosphorylation site of TRPC6 under basal conditions. A recent study, which used an MS/MS approach similar to ours, revealed that *Drosophila* TRP is phosphorylated under unstimulated (dark) conditions [Voolstra et al., 2010], that Ser⁷²¹ and Ser⁹³⁶ are highly phosphorylated in the dark, and that Ser⁹³⁶ is dephosphorylated in the presence of light, a phenomenon that requires the activation of the phototransduction cascade. Our study showed that Ser⁸¹⁴ of TRPC6 is phosphorylated under unstimulated conditions, but that the mutation of Ser⁸¹⁴ does not modify the activity of TRPC6 (Fig. 3).

A sequence analysis of TRPC6 revealed that Ser⁸¹⁴ is within a consensus site for phosphorylation by CK2 (S/T-X-X-D/E). Furthermore, CK2 favors an acidic environment as indicated by the results of Meggio *et al.*, who showed that any acidic residue in positions -2 to +7 favors phosphorylation by CK2 [Meggio et al., 1994]. In TRPC6, a glutamate in position +2 and an aspartate in position +3 of Ser⁸¹⁴ constitute a favorable acidic environment for CK2. CK2 is also known to exhibit constitutive activity, making it a potential kinase for the basal phosphorylation of Ser⁸¹⁴. Moreover, the subcellular location and functioning of TRPP2 is modulated by the phosphorylation by CK2 [Cai et al., 2004; Köttingen et al., 2005]. CK2 can phosphorylate the NR2B subunit of NMDAR, decreasing its surface expression [Chung et al., 2004], or NHE3, stimulating its basal

activity [Sarker et al., 2008]. However, we showed that the inhibition of CK2 by DMAT and TBCA does not reduce the basal phosphorylation level of TRPC6 or TRPC6^{S814A}. We also verified whether CK2 could indirectly regulate Ca²⁺ signaling in TRPC6-expressing cells. It has previously been shown that the calcium-sensitive potassium channel K_{Ca}2.2 loses Ca²⁺ sensitivity following CaM phosphorylation by CK2 [Bildl et al., 2004]. However, we showed that inhibition of CK2 does not modify CCh-induced Ca²⁺ entry into HEK293 cells stably expressing TRPC6 (T6.11) despite the fact that it does enhance CCh-induced Ca²⁺ release. Similarly, in A7r5 cells expressing high levels of TRPC6, the inhibition of CK2 with DMAT did not affect AVP-induced Ca²⁺ release or Ca²⁺ entry. We thus showed that CK2 does not modulate the activity of TRPC6.

In summary, we showed that the serine in position 814 of TRPC6 is phosphorylated under basal conditions in HEK293 cells, and that it accounts for one of two distinct basal phosphorylation sites. Our results further showed that CK2 is not the kinase responsible for these phosphorylations, and that CK2 does not directly or indirectly modify TRPC6 activity. Further studies will be needed to identify the kinase responsible for these phosphorylations.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Quebec Heart & Stroke Foundation. G.B. is the recipient of a scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec. This work is part of S.M.B.'s PhD thesis at the Université de Sherbrooke.

Abbreviations

[Ca²⁺]_i, intracellular concentration of Ca²⁺; AVP, arginine vasopressin; CaM, calmodulin; CCh, carbachol; CK2, casein kinase 2; GqPCR, Gq-protein coupled receptor; HA, hemagglutinin; HEK293, human embryonic kidney cell clone 293; IP3, inositol 1,4,5-trisphosphate; MS/MS, tandem mass spectrometer; PKC, protein kinase C; PKG, protein kinase G; RTK, receptor tyrosine kinase; TRP, transient receptor potential.

REFERENCES

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 2002. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Green Publishing Associates and Wiley Interscience.
- Beausoleil S, Villén J, Gerber S, Rush J, Gygi S. 2006. A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nat Biotechnol* 24:1285-92.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1:11-21.
- Bidl W, Strassmaier T, Thurm H, Andersen J, Eble S, Oliver D, Knipper M, Mann M, Schulte U, Adelman J, Fakler B. 2004. Protein kinase CK2 is coassembled with small conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels and regulates channel gating. *Neuron* 43:847-58.
- Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang MS, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L. 1997. Cloning and expression of a novel Mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the G(q) class of G protein. *Journal of Biological Chemistry* 272:29672-29680.
- Bousquet S, Monet M, Boulay G. 2010. Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition. *Journal of Biological Chemistry*.
- Cai Y, Anyatonwu G, Okuhara D, Lee K, Yu Z, Onoe T, Mei C, Qian Q, Geng L, Witzgall R, Ehrlich B, Somlo S. 2004. Calcium dependence of polycystin-2 channel activity is modulated by phosphorylation at Ser812. *J Biol Chem* 279:19987-95.
- Chung H, Huang Y, Lau L, Haganir R. 2004. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* 24:10248-59.

- El Boustany C, Bidaux G, Enfissi A, Delcourt P, Prevarskaya N, Capiod T. 2008. Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology* 47:2068-77.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* 260:3440-50.
- Hassock S, Zhu M, Trost C, Flockerzi V, Authi K. 2002. Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood* 100:2801-11.
- Havlis J, Thomas H, Sebela M, Shevchenko A. 2003. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem* 75:1300-6.
- Hisatsune C, Kuroda Y, Nakamura K, Inoue T, Nakamura T, Michikawa T, Mizutani A, Mikoshiba K. 2004. Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 279:18887-18894.
- Jung S, Strotmann R, Schultz N, Plant TD. 2002. TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 282:C347-C359.
- Keller A, Nesvizhskii A, Kolker E, Aebersold R. 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74:5383-92.
- Kim JY, Saffen D. 2005. Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *Journal of Biological Chemistry* 280:32035-32047.
- Köttgen M, Benzing T, Simmen T, Tauber R, Buchholz B, Feliciangeli S, Huber T, Schermer B, Kramer-Zucker A, Höpker K, Simmen K, Tschucke C, Sandford R, Kim E, Thomas G, Walz G. 2005. Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J* 24:705-16.
- Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L. 2007. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:4682-4687.
- Mani B, Brueggemann L, Cribbs L, Byron K. 2009. Opposite regulation of KCNQ5 and TRPC6 channels contributes to vasopressin-stimulated calcium spiking responses in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Cell Calcium* 45:400-11.
- Meggio F, Marin O, Pinna L. 1994. Substrate specificity of protein kinase CK2. *Cell Mol Biol Res* 40:401-9.
- Nesvizhskii A, Keller A, Kolker E, Aebersold R. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 75:4646-58.

Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological Reviews* 87:165-217.

Reiser J, Polu KR, Moller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei CL, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR. 2005. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nature Genetics* 37:739-744.

Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor.

Sanger F, Nicklen S, Coulson A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-7.

Sarker R, Grønborg M, Cha B, Mohan S, Chen Y, Pandey A, Litchfield D, Donowitz M, Li X. 2008. Casein kinase 2 binds to the C terminus of Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3) and stimulates NHE3 basal activity by phosphorylating a separate site in NHE3. *Mol Biol Cell* 19:3859-70.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68:850-8.

Soboloff J, Spassova M, Xu W, He LP, Cuesta N, Gill DL. 2005. Role of endogenous TRPC6 channels in Ca²⁺ signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 280:39786-39794.

Takahashi S, Lin H, Geshi N, Mori Y, Kawarabayashi Y, Takami N, Mori M, Honda A, Inoue R. 2008. Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. *J Physiol* 586:4209-23.

Voolstra O, Beck K, Oberegelsbacher C, Pfannstiel J, Huber A. 2010. Light-dependent phosphorylation of the drosophila transient receptor potential ion channel. *J Biol Chem* 285:14275-84.

Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howel DN, Vance JM, Rosenberg PB. 2005. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308:1801-1804.

Yu Y, Fantozzi L, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JXJ. 2004. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:13861-13866.

Yu Y, Keller S, Remillard C, Safrina O, Nicholson A, Zhang S, Jiang W, Vangala N, Landsberg J, Wang J, Thistlethwaite P, Channick R, Robbins I, Loyd J, Ghofrani H, Grimminger F, Schermuly R, Cahalan M, Rubin L, Yuan J. 2009. A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119:2313-22.

Zhu X, Jiang MS, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L. 1996. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell* 85:661-671.

DISCUSSION

Phosphorylation de TRPC6 par la PKC

La phosphorylation des TRPC a été démontrée dans de nombreuses études comme étant un mécanisme de régulation de l'entrée de Ca^{2+} . Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'établir qu'au moins deux kinases différentes peuvent phosphoryler TRPC6, soit la PKC et une autre, encore non-identifiée, responsable de la phosphorylation basale. Nous identifions la sérine en position 448 comme résidu phosphorylé par la PKC et responsable de l'inhibition de l'activité canal de TRPC6, dans les cellules HEK293. Nous identifions aussi la sérine en position 814 comme étant un site de phosphorylation majeur en conditions basales, toujours dans les cellules HEK293. Malgré que la sérine en position 814 soit située dans un site consensus pour une phosphorylation par la CK2, cette phosphorylation n'est pas dépendante de la CK2, comme l'a démontré le marquage métabolique de TRPC6 en présence d'inhibiteurs spécifiques de la CK2.

La phosphorylation de TRPC6 par la PKC avait déjà été suggérée (Shi et al., 2004). Dans cette étude, Shi *et al.* démontrent que l'inhibition de la PKC, via l'utilisation de la calphostine C ou d'un peptide inhibiteur, ralentit l'inactivation du courant entrant de TRPC6 (I_{TRPC6}). Une étude portée sur TRPC3 démontrait que la sérine en position 712 est phosphorylée par la PKC et est responsable de l'inhibition de l'activité canal de TRPC3 par la PKC. La mutation S712A prévient en effet la phosphorylation de TRPC3 induite par le PMA, un activateur des PKC, et prévient aussi l'inhibition de l'activité (Trebak et al., 2005).

Par homologie de séquence, la sérine 712 de TRPC3 équivaut à la sérine 768 de TRPC6, située dans un domaine conservé chez les TRPC, PSPKS. Une étude a par la suite suggéré que la sérine 768 de TRPC6 était phosphorylée par la PKC (Kim et Saffen, 2005). Les auteurs de cette étude ont utilisé un anticorps antiphosphosérine spécifique à la PKC afin de démontrer la phosphorylation de TRPC6 dans les cellules PC12D. Nous avons de notre côté testé ce même anticorps dans notre modèle de cellules HEK293 qui expriment TRPC6 de façon stable ou transitoire mais nous n'avons pas été en mesure de détecter une

phosphorylation de TRPC6 (résultat non montré). De plus, l'inhibition de l'activité de TRPC6 par la PKC, quoique mal caractérisée lors de la parution de cette étude, était déjà un phénomène bien établi. Les auteurs n'ont cependant pas su démontrer que la phosphorylation de la sérine 768 était responsable de cette inhibition. Dans les cellules HEK293, nos résultats démontraient que l'activité du mutant S768A conservait sa capacité à être amplifiée par le GF1, suggérant la présence d'au moins un autre site de phosphorylation par la PKC. Le GF1 fût d'ailleurs l'outil principal utilisé afin d'inhiber la PKC et évaluer les effets de cette inhibition sur l'activité d'entrée de Ca^{2+} ou de Ba^{2+} médiée par TRPC6.

À ce jour, le mécanisme sous-jacent à l'inhibition de TRPC6 par la PKC (que ce soit α ou δ) n'est pas connu. Il en va de même pour l'inhibition des canaux Kv. Il est connu par contre que la phosphorylation par la PKC de TRPV1 augmente sa sensibilité à la capsaïcine, son agoniste, et à la chaleur (Adcock, 2009). Il est donc possible que la phosphorylation de la sérine 448 de TRPC6 diminue la sensibilité du canal au DAG, réduisant ainsi son activité. Il se peut aussi que la phosphorylation induise un changement conformationnel de la protéine nuisant à l'ouverture du pore. Nous excluons toutefois que la phosphorylation puisse inhiber le routage et l'assemblage des sous-unités d'un tétramère, puisque des études de biotinylation des protéines de surface montrent que la modulation de la PKC ne régule pas la quantité de canaux présents à la membrane plasmique (résultat non montré). De futures études seront ainsi nécessaires afin d'élucider le mécanisme d'inhibition de TRPC6 par la PKC.

Phosphorylation par différentes isoformes de la PKC

Comme mentionné auparavant, nous avons utilisé les cellules HEK293 comme modèle cellulaire, alors que Kim et Saffen ont obtenu leurs résultats à l'aide de cellules PC12D, un modèle cellulaire neuronal dérivé de phéochromocytome de médullo-surrénale de rat. Dans ce modèle, TRPC6 est localisé dans un complexe multiprotéique incluant la PKC α (Kim et Saffen, 2005). Dans nos cellules HEK293, la PKC α ne semble pas intervenir dans la régulation de l'activité de TRPC6, puisque l'inhibiteur Gö6976, en mesure d'inhiber

les PKC α , β I, β II et ϵ , ne réussit pas à amplifier l'entrée de calcium. Le GF1 et le Gö6983, quant à eux, inhibent les même isozymes, en plus de la PKC δ . Bien que nous ne confirmons pas que c'est bel et bien la PKC δ qui phosphoryle TRPC6 dans les HEK293, plusieurs indices pointent en ce sens. Est-ce que les PKC δ et α sont exprimées différemment dans les PC12D et les HEK293? Ou s'agit-il d'une différence de localisation cellulaire? Dans les cellules photoréceptrices de l'œil de la drosophile, la protéine InaD agit comme protéine d'échaffaudage pour dTRP et la PKC (appelée *eye-PKC* dans l'œil de la drosophile), permettant le rapprochement des deux protéines et favorisant du même coup la phosphorylation de dTRP sur la sérine 982 et l'inactivation subséquente [voir (Popescu et al., 2006) pour revue]. Existe-t-il une protéine d'échaffaudage dans les cellules PC12D permettant la phosphorylation de la Ser768 par la PKC α et qui est absente dans les HEK293? Ceci pourrait expliquer les différences observées entre l'étude de Kim et Saffen et la nôtre. Il semble par contre que les PKC α et δ soient toutes deux exprimées à la fois dans les PC12 et les HEK293, alors que plusieurs études utilisent ces modèles cellulaires pour étudier les effets de ces deux isozymes.

Nous avons aussi procédé à des études de phosphorylation *in vitro* avec TRPC6 immunoprécipité à partir de lysats de cellules HEK293 l'exprimant de façon stable. Nous démontrions alors que les PKC β I, γ et δ recombinantes phosphorylaient efficacement TRPC6, alors que la PKC α n'y arrivait pas (résultat non montré). Ceci appuyait notre hypothèse de l'implication d'une isozyme autre que α , comme le faisait nos essais de fonctionnalité. De futures études seront nécessaires afin de déterminer si les PKC β I ou γ ont un rôle à jouer dans la phosphorylation *in vivo* de TRPC6.

Les PKC α et δ appartiennent à deux familles de PKC différentes (Mellor et Parker, 1998). Les α , β I, β II et γ composent la famille des PKC classiques, activées par le Ca²⁺ et le DAG, via leurs domaines C2 et C1, respectivement. Les δ , ϵ , η , σ et μ sont les PKC nouvelles, et ne contiennent pas de domaine C2. Elles sont donc indépendantes du Ca²⁺ et sont activées par le DAG. Les ξ et λ sont des PKC atypiques. Elles n'ont pas de domaine C2 et comportent un domaine C1 tronqué. Les modes de régulation et d'activation des PKC atypiques sont encore aujourd'hui très mal connus. Jusqu'à présent, notre étude suggère un rôle potentiel de la PKC δ dans la phosphorylation de TRPC6 dans les cellules

HEK293. Nos résultats obtenus avec les cellules A7r5 appuient le rôle de la PKC δ dans la phosphorylation de TRPC6. L'expression de TRPC6 dans ce modèle cellulaire a été démontrée comme tributaire de l'entrée de calcium induite par la vasopressine (Jung et al., 2002; Mani et al., 2009; Soboloff et al., 2005). Nous démontrons clairement l'implication de la PKC δ dans la phosphorylation de TRPC6 dans les A7r5 avec l'utilisation du Gö6983 et du Gö6976. Ces deux inhibiteurs de PKC ne diffèrent que par leur effet sur la PKC δ , alors que le premier l'inhibe et pas le second (Martiny-Baron et al., 1993). Dans les conditions où la PKC δ est inhibée, l'entrée de calcium induite par la vasopressine est augmentée. De même, nous démontrons qu'un ARN interférent dirigé contre la PKC δ amplifie l'entrée de calcium dans ces cellules.

L'activation de TRPC6 et de la PKC par le DAG

Un des moyens que nous avons utilisé pour activer TRPC6 et étudier sa régulation par la PKC est l'activation directe par l'OAG. Cet analogue non métabolisable du DAG a été démontré pour activer TRPC3 et TRPC6 indépendamment de la PKC (Hofmann et al., 1999). Dans notre modèle de cellules T6.11, l'OAG induit une entrée calcique qui est amplifiée par le GF1 et inhibée par le PMA (Figure 4, Bousquet *et al.*, 2010). Le DAG aurait ainsi des rôles opposés sur l'entrée de calcium, soit en activant TRPC3 et 6 (augmentation de l'entrée) et en activant les PKC, qui inhibent les TRPC3, 4, 5 et 6 (diminution de l'entrée). L'OAG a d'ailleurs été utilisé pour activer la PKC et les TRPC afin d'évaluer ses doubles effets (Venkatachalam et al., 2003). Dans l'étude de Venkatachalam *et al.*, les auteurs utilisent des inhibiteurs de la DAG kinase ou de la DAG lipase, deux enzymes impliquées dans le métabolisme du DAG. Ces inhibiteurs mènent à l'élévation des concentrations cytosoliques de DAG, ce qui prévient l'activation de TRPC4 et TRPC5, comme le fait l'application d'OAG. Cette inhibition de l'activité des TRPC4 et TRPC5 est démontrée pour être dépendante de la PKC puisqu'un co-traitement avec le GF1 prévient cette inhibition. À l'inverse, ces mêmes inhibiteurs des DAG lipase et DAG kinase, ainsi que l'application directe d'OAG, augmentent l'activité de TRPC3 et ce, indépendamment de la PKC. Cette étude démontre que TRPC3 est activé directement par l'OAG, ce qui peut être diminué par une activation concomitante de la PKC, ou

augmenté par une inhibition de la PKC. L'activation dépendante du DAG est donc plus forte et prend le dessus sur l'inhibition de TRPC3 dépendante de la PKC. Nos résultats suggèrent que ceci est aussi applicable à TRPC6.

On peut aussi expliquer l'effet du DAG et de l'OAG sur l'activité de TRPC3 et TRPC6 en supposant qu'ils ne sont peut-être pas en mesure d'activer totalement la population de PKC. Aussi, il n'est pas connu à ce moment si un canal TRPC6 phosphorylé par la PKC est complètement inhibé ou s'il existe une activité résiduelle. Nous ne savons pas non plus si tous les canaux membranaires vont être phosphorylés suite à l'activation de la PKC, mais on peut en douter. La PKC δ , comme la majorité des PKC, va majoritairement se retrouver au niveau des membranes suite à son activation [voir (Steinberg, 2004) pour revue], soit au niveau des canaux calciques membranaires. La PKC δ étant indépendante du Ca^{2+} , on peut penser que l'OAG l'activerait totalement, par opposition aux PKC classiques qui nécessiteraient une augmentation concomitante de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Par contre, nos résultats et ceux de Trebak (Trebak et al., 2005) avec TRPC3 montrent que le PMA permet une inhibition de l'entrée induite par l'OAG, ce qui prouve que l'activation des PKC par l'OAG n'est pas complète dans les cellules HEK293. Aussi, puisque l'inhibition de la PKC par le GF1 amplifie l'entrée de calcium médiée par TRPC6 et induite par l'OAG, il est forcé de croire que la PKC est préalablement, ou à tout le moins simultanément, activée. Somme toute, nous proposons un modèle dans lequel l'OAG active simultanément la PKC et TRPC6. La PKC est ainsi partiellement activée, menant à la phosphorylation d'une population des molécules de TRPC6, ce qui fait que nous enregistrons une entrée calcique globale intermédiaire. Le GF1 prévient l'activation de la PKC, ce qui maximise l'entrée de calcium induite par l'OAG. Le PMA mène à l'activation complète de la PKC, augmentant ainsi la proportion de TRPC6 phosphorylé, réduisant ainsi la réponse calcique globale. L'OAG a d'ailleurs déjà été utilisé par le passé à 25 μM afin de partiellement activer la PKC (Li et al., 1993). Une autre étude portant sur la régulation des fonctions cardiaques par la PKC démontre que l'OAG mime les effets des phorbols esters, mais avec une efficacité beaucoup moindre (Yuan et al., 1987). Ces deux dernières études supportent notre hypothèse d'activation partielle des PKC par l'OAG.

Puisque TRPC4 et TRPC5 ne sont pas activés directement par le DAG, l'élévation des concentrations intracellulaires de DAG (via les inhibiteurs de DAG kinase ou lipase, ou via l'OAG) ne peut mener qu'à l'activation de la PKC, ce qui inhibe l'activité de ces canaux (Venkatachalam et al., 2003). La Figure 5 résume les actions cellulaires directes et indirectes du DAG sur les canaux calciques.

Bien que l'activation de TRPC3 et 6 par le DAG semble un fait bien établi, peu d'études se sont intéressées à sa mécanistique. L'équipe du Dr Donald L. Gill s'est penchée sur la question et propose que TRPC6 puisse être activé de façon mécanique, ce qui passerait par un mécanisme similaire à son activation dépendante d'un récepteur. Dans une de leurs études, ils soutiennent que TRPC6 est un senseur de l'étirement de la membrane plasmique induite mécaniquement ou de façon osmotique. Ils utilisent le GsMTx-4, un peptide issu du venin de la tarentule connu pour inhiber spécifiquement les canaux mécanosensibles en modifiant l'interface protéine – lipides membranaires. Ils démontrent que TRPC6 exprimé dans des cellules HEK293 ou CHO est activé suite à un étirement membranaire induit par un stimulus hypoosmotique ou une pression mécanique. Cette activation de TRPC6 est indépendante de la PLC et inhibée par le GsMTx-4. Ils montrent aussi que l'activation de TRPC6 par un agoniste Gq-PLC ou par l'OAG est également prévenue par le GsMTx-4. Leur modèle d'activation de TRPC6 par le DAG soutient qu'en conditions basales, TRPC6 est entouré de molécules de PIP₂ dans le feuillet lipidique interne. L'hydrolyse du PIP₂ en DAG, ou l'ajout direct d'OAG, change drastiquement la géométrie lipidique du feuillet interne, créant une incurvation localisée de la membrane plasmique autour de TRPC6, menant à son ouverture (Spassova et al., 2006a).

Le DAG active-t-il directement et spécifiquement TRPC3 et TRPC6? Ou est-ce que n'importe quels lipides changeant l'environnement lipidique pourraient les activer? TRPC3 et TRPC6 sont-ils en fait des mécanosenseurs? De futures études permettront de répondre à ces questions cruciales à la compréhension du mécanisme d'activation de TRPC3 et TRPC6.

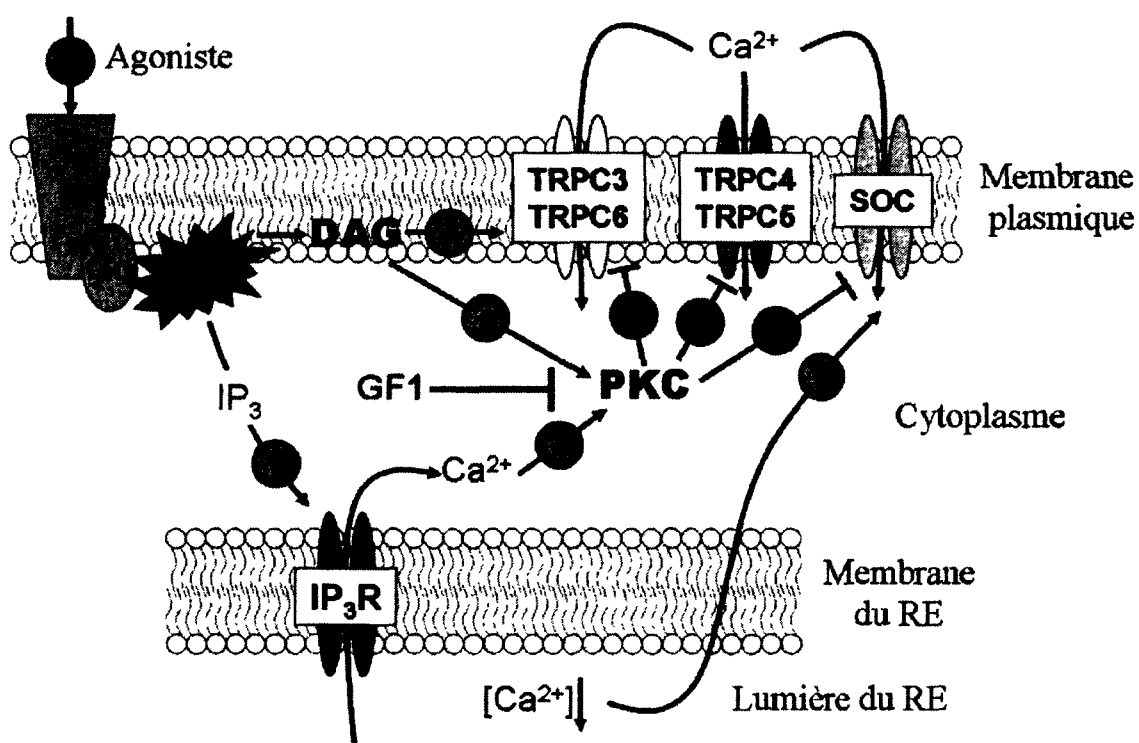


Figure 5. **Régulation des TRPC par le DAG et la PKC.**

Le DAG, issu de l'activité de la PLC, active directement TRPC3 et TRPC6. Par contre, il active aussi la PKC, qui inhibe TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 et les canaux SOC. Adaptée de (Venkatachalam et al., 2003).

Identification du site de phosphorylation par la PKC

Dans cette étude, nous avons testé tous les sites canoniques intracellulaires de phosphorylation par la PKC, soit S/T-X-R/K, de TRPC6. Tous les mutants alanine ont été générés et la fonctionnalité de ceux qui s'exprimaient correctement a été testée pour leur capacité à être amplifiée par le GF1. Tous ont démontré une potentiation de l'entrée de Ba^{2+} induite par le CCh suite à un co-traitement avec le GF1. De plus, les résultats divergents suite à l'utilisation du Gö6983 et du Gö6976, ainsi que ceux obtenus suite aux essais de phosphorylation *in vitro*, nous ont poussés à vérifier les sites non canoniques de phosphorylation, particulièrement les sites PKC δ . La sérine 448 a ainsi été suggérée par le logiciel de prédiction de phosphorylation GPS2.1 (Xue et al., 2008). Cette région est très bien conservée chez TRPC3 et TRPC7, qui appartiennent à la même sous-famille des TRPC que TRPC6, alors qu'elle est moins bien conservée chez TRPC1, 4 et 5, quoiqu'encore favorable pour une phosphorylation dépendante de la PKC δ . La régulation de TRPC3 par la PKC a déjà été étudiée et s'effectue sur la sérine 712, mais l'identité de l'isozyme impliquée reste à déterminer (Trebak et al., 2005). La régulation de TRPC7 par la PKC semble similaire à celle de TRPC6, alors qu'un prétraitement de cellules HEK exprimant TRPC7 de façon stable au GF1 augmente l'influx de Mn^{2+} induit par l'OAG (Okada et al., 1999). Vazquez *et al* ont démontré que TRPC7 exprimé de façon transitoire dans les cellules DT40 est activé par l'OAG lorsque la PKC est inhibée. Dans cette étude, ils décrivent un mécanisme d'activation de TRPC7 dépendant de l'IP $_3$ R et de l'inhibition de la PKC. Cette inhibition n'est toutefois pas nécessaire si TRPC7 est plus hautement exprimé, altérant ainsi la stœchiométrie TRPC7/IP $_3$ R (Vazquez et al., 2006). Aucune de ces études ne démontre une régulation directe de TRPC7 par la PKC, surtout la seconde qui semble soutenir que c'est l'IP $_3$ R qui est régulé par la kinase. De plus, s'il y a phosphorylation directe de TRPC7 par la PKC, le résidu impliqué reste à déterminer. Étant donné la grande homologie de séquence entre TRPC3, TRPC6 et TRPC7, les premiers sites à privilégier seraient donc les résidus Ser394 et Ser714 de la séquence humaine de TRPC7, équivalentes aux résidus Ser448 de TRPC6 et Ser712 de TRPC3 (et Ser768 de TRPC6), respectivement. À l'inverse, une étude soutient que dans les cellules HaCaT, où TRPC7 est grandement responsable de l'entrée de calcium induite par l'ATP,

le CCh et l'OAG, l'activité de la PKC affecte très peu l'entrée de calcium (Beck et al., 2006).

Parmi les mutants alanine générés, T629A et S928A n'ont pas été investigués en raison de leur faible expression. Nous avons observé que la transfection de T629A-TRPC6 dans les cellules HEK293T provoquait la mort des cellules, ce qui empêchait ainsi toutes études portant sur le résidu thréonine 629. Similairement, Trebak *et al* démontrent que la mutation du résidu thréonine 573 de TRPC3 d'humain en alanine, équivalent à T629 de TRPC6 murin, cause une perte d'expression de la protéine. Ils suggèrent que cet acide aminé joue un rôle crucial pour le routage ou l'expression appropriée de hTRPC3 (Trebak et al., 2005).

De plus, une récente étude a souligné l'implication de TRPC3 dans le phénotype *moonwalker* des souris, chez qui on observe l'ataxie cérébelleuse et un développement anormal des cellules de Purkinje. La mutation T635A de TRPC3 confère une plus grande activité au canal, ce qui altérerait la croissance et la différenciation des cellules de Purkinje, menant ainsi à l'ataxie (Becker et al., 2009). Chez la souris, la thréonine 635 de mTRPC3 équivaut à la thréonine 573 de TRPC3 d'humain et à la thréonine 629 de TRPC6; située dans la deuxième boucle intracellulaire, très près de la région pore. Nous avons donc pensé que la mutation T629A pouvait rendre TRPC6 constitutivement actif, induisant une entrée calcique dérégulée et menant à la mort cellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré des versions dominantes négatives de T629A-TRPC6 en ajoutant les triples mutations. Ces mutations, NML(720-722)FAP (Bernier, 2005) et LFW(678-680)AAA (Hofmann et al., 2002) confèrent un caractère dominant négatif à TRPC6 en empêchant l'ouverture du canal et l'entrée de calcium. Ces mutations n'altèrent toutefois pas l'expression ou le routage de TRPC6. Des résultats préliminaires montrent que l'expression de T629A/NML(720-722)FAP n'induit pas la mort cellulaire, ce qui confirme que la simple mutation T629A cause la mort cellulaire à cause d'une activité dérégulée (résultats non montrés). Puisque T629 fait partie d'un site consensus de phosphorylation par la PKC, nous avons alors considéré que la mutation T629A pouvait empêcher la rétroaction négative induite par la PKC sur TRPC6, menant à une entrée calcique trop forte menant à la mort cellulaire. Ayant identifié la sérine 448 comme étant

la cible de la PKC sur TRPC6 dans notre modèle cellulaire, nous excluons maintenant cette hypothèse. Il est toutefois connu que chez les canaux potassiques dépendants du voltage (canaux Kv), la deuxième boucle intracellulaire entre les quatrième et cinquième segments transmembranaires, nommée S4-S5 *linker*, est importante pour l'activité des canaux. En effet, il est démontré que l'interaction de cette région avec les queues N- et C-terminales est importante pour l'activation de Kv2.1 (Schollé et al., 2004). La cristallographie a révélé que l'activation de Kv1.2 favorise l'interaction du S4-S5 *linker* avec la région S6b, constituée de la fin du sixième segment transmembranaire et du début du C-terminal (Long et al., 2005). La compatibilité et l'interaction entre ces régions ont été démontrées comme étant essentielles pour l'ouverture des Kv (Labro et al., 2008). Plus récemment, il a été démontré que pour le canal KCNQ1, la dépendance au voltage passe par la liaison dépendante du voltage du S4-S5 *linker* au domaine pore. En effet, cette étude décrit un mécanisme d'activation qui suggère que dans l'état fermé, le S4-S5 *linker* est lié au S6 (S6b). Suite à une dépolarisation membranaire, le domaine S4 tire sur le S4-S5 *linker* hors de la portée du S6, permettant l'ouverture du canal (Choveau et al., 2010; Choveau et al., 2010).

La sérine 448 de TRPC6 et la PKC δ

Nous démontrons dans notre étude que la phosphorylation de TRPC6 par la PKC se fait sur la sérine 448. Suivant le profil d'hydrophobicité de TRPC6 et l'attribution des segments transmembranaires putatifs, cette sérine est située au tout début du premier segment transmembranaire (Figure 6). Cette localisation intramembranaire peut sembler problématique mais il est important de souligner que les acides aminés formant les segments transmembranaires sont attribués par des logiciels de prédiction efficaces, mais il reste qu'il s'agit de prédiction. Étant donné aussi que les PKC actives lient le DAG membranaire pour s'y ancrer, il est normal qu'elles soient en mesure de phosphoryler des cibles près des membranes où elles se trouvent, bien qu'elles aient aussi des substrats cytosoliques. Le site de phosphorylation Ser448 n'est pas un site classique de phosphorylation par la PKC, S/T-X-R/K, mais nous démontrons bel et bien sa phosphorylation dépendante de la PKC. Elle fait par contre partie d'une séquence

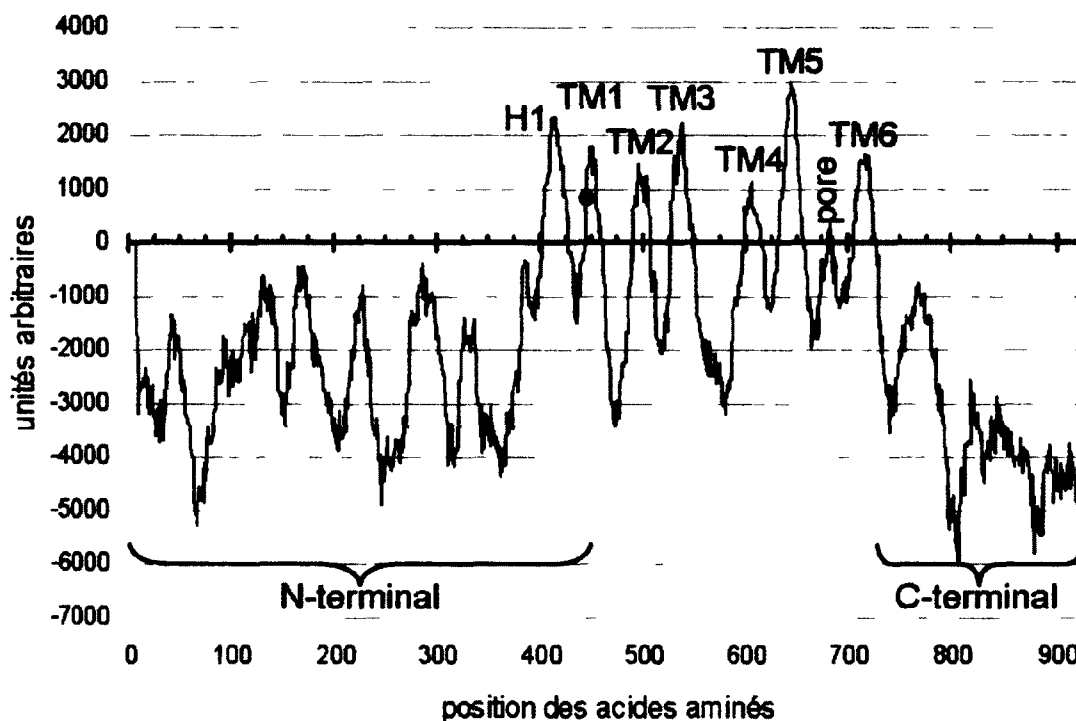


Figure 6. Profil d'hydrophobicité de la séquence murine de TRPC6.

Selon le logiciel TMPred, qui prédit les régions transmembranaires et leur orientation, la sérine 448, identifiée par le point rouge, se situe au début du premier segment transmembranaire (TM1). La première région transmembranaire suggérée est en fait une région hydrophobe (H1) qui s'ancre sans traverser la membrane plasmique. Le pore de TRPC6 est une invagination de la protéine dans la membrane entre les TM5 et TM6. Les segments membranaires, toujours selon TMPred, sont constitués des acides aminés aux positions suivantes : H1, 406-424; TM1, 442-461; TM2, 490-507; TM3, 527-548; TM4, 592-613; TM5, 637-655; TM6, 702-727. La sérine 448 serait donc le septième des 20 acides aminés du TM1. http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

favorable à une phosphorylation par la PKC δ , du moins selon le logiciel GPS2.1. Des études nous démontrent que des librairies de peptides orientés ont été utilisées afin de trouver la séquence optimale pour une phosphorylation par la PKC δ . Ces études démontrent que cette séquence est composée d'une Phe en position P+1 et de résidus hydrophobes en positions P+4 et P+5 [*i.e.* (S/T)FXX $\Phi\Phi$, où Φ est un résidu hydrophobe et X est n'importe quel acide aminé]. De plus, des résidus basiques en P+2, P+3 et P+4 nuisent à la phosphorylation (Fujii et al., 2004; Nishikawa et al., 1997). Dans notre cas, en commençant avec la Ser448, nous retrouvons la séquence SFTILF. Ces acides aminés sont parfaitement compatibles avec la séquence optimale de la PKC δ . Ceci nous pousse d'autant plus à croire que la sérine 448 de TRPC6 est phosphorylée par une isozyme non-classique de la PKC.

La modulation de l'entrée de calcium par la PKC δ a déjà fait l'objet d'autres études. Entre autres, il a été démontré que dans les cellules musculaires lisses d'artères intrapulmonaires de rat, la sphingosyl-phosphorylcholine amplifie la réponse contractile induite par la prostaglandine F $_{2\alpha}$ et l'U436619, deux activateurs de canaux cationiques non sélectifs. Cette potentiation, attribuée à l'augmentation de l'entrée de calcium, est prévenue par l'inhibiteur de PKC à large spectre Ro-31-8220, mais pas par le Gö6976 (Snetkov et al., 2008). Il a aussi été remarqué que dans les mastocytes déficients en PKC δ , un type cellulaire exprimant TRPC6 (Sanchez-Miranda et al., 2010; Sel et al., 2008), les $[Ca^{2+}]_i$ sont élevées (Leitges et al., 2002).

L'activation de la PKC et la signalisation calcique

Lors des premiers essais de modulation de l'activité de TRPC6 par la PKC, nous avons utilisé le PMA dans les cellules T6.11 pour activer la PKC. Nous avons alors observé que la relâche calcique induite par le CCh était grandement réduite, biaisant par le fait même nos résultats d'entrée de calcium. C'est pourquoi nous avons fait les essais dans les cellules HEK293 traitées avec l'ATP, alors que cet agoniste des récepteurs purinergiques cause une relâche qui n'est que très peu affectée par le PMA. D'autres récepteurs ont été démontrés pour être inhibés par la PKC, tels le récepteur muscarinique M2 (Hosey et al.,

1995), le récepteur du cystéinyl leukotriène du type 1 (CysLT1R) (Deshpande et al., 2007) et les récepteurs à l'IP₃ de type 2 et 3 (Arguin et al., 2007; Caron et al., 2007). Afin de comprendre les effets du PMA sur la relâche, nous avons alors dosé les inositols-phosphates dans les cellules T6.11 stimulées avec le CCh, permettant ainsi la mesure de la production d'IP₃ dans ces cellules. Nous avons observé qu'un prétraitement au PMA inhibait presque totalement la production d'IP₃ induite par le CCh, expliquant la faible relâche calcique observée. Le GF1 augmentait cette production d'IP₃ (résultat non montré). Nous ne savons toutefois pas si cette modulation de la production d'IP₃ passe par la régulation du récepteur muscarinique, de la protéine G hétérotrimérique $\alpha\beta\gamma$ ou de la PLC β . Le fait que les relâches calciques induites par l'ATP soient peu affectées par l'activation de la PKC par le PMA porte à croire que la signalisation cellulaire n'est pas affectée. De même, l'inhibition de la PKC par le GF1 n'amplifie pas la relâche calcique induite par le CCh. L'augmentation de la production d'IP₃ par le GF1 n'est pas suffisante pour accroître la relâche calcique, mais peut-elle influencer l'entrée de calcium médiée par TRPC6?

La phosphorylation basale de TRPC6

Les résultats sur la phosphorylation de TRPC6 par la PKC démontrent aussi que TRPC6 est phosphorylé de façon basale. Ainsi, dans un deuxième temps, nous caractérisons cette phosphorylation basale. Nous avons donc procédé à l'analyse MS/MS de TRPC6 pour identifier les peptides phosphorylés. Des dizaines de résidus sérine, thréonine et tyrosine potentiellement phosphorylés ont ainsi été répertoriés. L'analyse approfondie des spectres de fragmentation des peptides réduit à trois le nombre de peptides phosphorylés, dont un sur lequel la phosphorylation peut être située sur deux sites distincts. Ces quatre sites (Ser14, Ser814, Ser902 et Thr905) ont été mutés en résidus alanine et les mutants ont été testés en marquage métabolique pour leur capacité à incorporer le phosphate inorganique radiomarké. C'est de cette façon que nous avons montré que la sérine en position 814 est phosphorylée en conditions basales dans TRPC6.

L'identification de sites de phosphorylation sur des canaux par spectrométrie de masse a déjà été effectuée par d'autres équipes (Park et al., 2008; Peng et al., 2010). Récemment, une étude a tiré profit de cette technique pour identifier des événements de phosphorylation de TRP chez la drosophile. Les auteurs ont montré que la sérine 936 de dTRP dans le rhabdomère est phosphorylée si les mouches sont tenues dans l'obscurité. L'activation de la phototransduction chez ces mouches induit la déphosphorylation de la sérine 936. À l'inverse, les auteurs ont identifié sept peptides (contenant plus de sept sites potentiels) phosphorylés de façon dépendante de la lumière. En plus des nombreux sites consensus PKC, les auteurs ont identifié les sites de phosphorylation Ser828, Ser936 et Ser964 comme faisant partie de sites consensus pour la CK1 ou la CK2 (Voolstra et al., 2010). Un des sites de phosphorylation identifiés de dTRP, soit la sérine 726, peut être associé par homologie de séquence à la sérine 822 de la séquence murine de TRPC6. La sérine 822 de TRPC6 n'appartient à aucun site consensus et le logiciel GPS2.1 ne le considère pas comme un site de phosphorylation potentiel pour aucune kinase.

Dans le cas qui nous concerne, comment expliquer que les autres sites identifiés par spectrométrie de masse ne soient pas phosphorylés, à en croire le marquage métabolique, alors que la fragmentation confirmait bien la phosphorylation? Même que le peptide sur lequel se trouve la sérine 14 n'a pas été retrouvé non phosphorylé lors des études de spectrométrie de masse. L'hypothèse majeure que nous amenons passe par nos méthodes de culture cellulaire et de marquage métabolique. En effet, préalablement à l'analyse MS, TRPC6 est purifié à partir de cellules T6.11 en culture, ce qui implique la présence de sérum bovin fœtal (FBS) dans le milieu de culture. Le FBS étant très riche en facteurs de croissance, cytokines et autres, la signalisation cellulaire dans les T6.11 est bien activée. On considère par contre qu'il n'y a pas de stimulation à proprement parler puisque nous n'ajoutons pas d'agoniste au milieu, comme le carbachol par exemple. Dans le cas du marquage métabolique, les cellules sont incubées pendant quatre heures dans du milieu dépourvu de phosphate, supplémenté en ^{32}P inorganique et, surtout, sans FBS. Ceci prévient ainsi toute signalisation due aux facteurs de croissance et autres molécules s'y trouvant. Les résidus en position 14, 902 ou 905 sont ainsi peut-être phosphorylés suite à la signalisation induite par le FBS, ce qui fait qu'en conditions de marquage métabolique, les muter en alanine ne change pas la phosphorylation globale de TRPC6.

La stimulation par les facteurs de croissance de la phosphorylation de TRPC6 ne serait d'ailleurs pas une surprise, surtout dans le cas de phosphorylation sur des résidus tyrosines. Fyn a été démontrée pour phosphoryler TRPC6 sur un résidu tyrosine, suite à la stimulation des cellules avec du EGF qui active un RTK, l'EGFR (Hisatsune et al., 2004). Fyn est une tyrosine-kinase appartenant à la famille des Src et interagit via son domaine SH2 (*Src homology*) avec le N-terminal de TRPC6. Parmi les résidus potentiellement phosphorylés mais qui n'ont pas été confirmés, l'analyse MS a identifié huit tyrosines, dont quatre en N-terminal. Il serait intéressant de vérifier la phosphorylation des ces tyrosines dans des cellules stimulées avec l'EGF, ou tout simplement après un sevrage des cellules en FBS.

TRPC4 avait aussi été démontré pour être phosphorylé sur des résidus tyrosine par Fyn, ce qui augmentait son activité. Ces événements de phosphorylation se font sur les tyrosines en position 959 et 972 de TRPC4 (Odell et al., 2005), qui ne sont pas conservées chez TRPC6 qui possède un C-terminal plus court que TRPC4.

Kinase impliquée dans la phosphorylation basale de TRPC6

La phosphorylation basale de TRPC6 avait aussi été observée par d'autres équipes. Dans des plaquettes sanguines non-stimulées, il est démontré par marquage métabolique que TRPC6 est faiblement phosphorylé (Hassock et al., 2002). À l'aide d'un anticorps antiphosphotyrosine, il est démontré que TRPC6 exprimé dans des cellules CHO est aussi phosphorylé dans des cellules non stimulées (Hisatsune et al., 2004). Notre étude est toutefois la première à s'intéresser à la fonction et à l'identité de cette phosphorylation. À l'aide du logiciel GPS2.1, nous avons déterminé que l'environnement de la sérine 814 présente une séquence consensus pour les kinases IRAK1, TAK1, KIS et CK2. IRAK1 (*Interleukin receptor-associated kinase 1*), étant impliquée dans la régulation du facteur NFκB par l'interleukine 1 (Gottipati et al., 2008), elle ne semblait pas être une candidate crédible pour la phosphorylation basale de TRPC6. De même pour TAK1 (*TGFβ-activated kinase 1*), membre de la famille des MAPKKK, aussi impliquée dans la signalisation de l'interleukine 1, mais également du TGFβ et d'autres molécules

proinflammatoires (DeLaney et Mlodzik, 2006). KIS (*kinase interacting with stathmin*) est connue pour phosphoryler la protéine stathmine et être surtout exprimée au niveau du cerveau (Bristow et al., 2009). La CK2 (caséine kinase 2) nous semblait donc être la kinase la plus probable. Elle requiert un résidu acide en position +3 et nous retrouvons deux résidus acides en positions +2 et +3 de la Ser814. Une étude portant sur la spécificité des substrats de la CK2 a d'ailleurs démontré que le résidu acide (ou une phosphosérine ou phosphotyrosine) en position +3 est crucial, mais aussi que tout autre résidu acide entre les positions -2 à +7 favorise aussi une phosphorylation par la CK2 (Meggio et al., 1994). De plus, la CK2 est connue pour avoir une activité constitutive (Guerra et al., 1999), ce qui en fait une bonne candidate pour effectuer une phosphorylation basale.

D'autres canaux ioniques ont été démontrés pour être phosphorylés par la CK2, dont un TRP. TRPP2 est en effet phosphorylé par la CK2 et ceci détermine la localisation cellulaire du canal ainsi que son activité (Cai et al., 2004; Köttgen et al., 2005). La CK2 peut phosphoryler la sous-unité N2RB du récepteur NMDAR, abaissant ainsi son expression à la membrane plasmique (Chung et al., 2004). NHE3 exhibe une activité plus grande suite à sa phosphorylation par la CK2 (Sarker et al., 2008).

Nos résultats de marquage métabolique démontrent toutefois que la CK2 n'est pas impliquée dans la phosphorylation basale de TRPC6, puisque des inhibiteurs spécifiques de la CK2 ne réduisent pas le niveau de phosphorylation. Il nous serait possible de tester si la phosphorylation basale est due à IRAK1, TAK1 ou KIS, grâce à des inhibiteurs spécifiques de ces kinases ou des ARN interférents, disponibles commercialement. KIS pourrait être particulièrement intéressante. Il a été démontré qu'elle phosphoryle p27^{Kip1}, un inhibiteur endogène des kinases dépendantes des cyclines (CDK). Bien que KIS soit surtout exprimée au cerveau, elle a un rôle crucial dans d'autres structures, puisque sa délétion a pour effet de diminuer la prolifération et d'accroître la migration des VSMC en favorisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S (Langenickel et al., 2008). Vu l'expression bien établie de TRPC6 dans les VSMC et son rôle dans la progression du cycle cellulaire, la phosphorylation de TRPC6 par KIS est une avenue de recherche attirante.

Implications de la phosphorylation de la sérine 814

Le rôle même de la phosphorylation de la sérine 814 de TRPC6 n'a pas encore été identifié. Elle ne semble pas importante pour l'activité de TRPC6 puisque la mutation S814A n'affecte pas l'entrée de calcium. L'expression totale de S814A-TRPC6 n'est pas différente de celle de TRPC6 de type sauvage, ni sa présence à la membrane plasmique, tel qu'observé dans des essais de biotinylation des protéines de surface (résultat non montré). Il est à noter qu'à ce jour, toutes les mesures d'expression, d'activité et de translocation à la membrane ont été effectuées dans des modèles de surexpression de TRPC6 ou du mutant TRPC6^{S814A}. Il est connu que la surexpression des TRPC peut influencer leur mode d'activation en modifiant la stœchiométrie TRPC : Orail, entre autres (Liao et al., 2007; Liao et al., 2009).

Bien que nous ayons démontré que la CK2 n'est pas impliquée dans la phosphorylation de TRPC6, nous nous sommes tout de même intéressés à savoir si elle pouvait indirectement réguler l'entrée de calcium. Il est connu que la CK2 peut phosphoryler la CaM, qui est liée au canal dépendant du calcium Kv2.2. La phosphorylation de la CaM réduit par un facteur cinq la sensibilité apparente du canal au calcium, ce qui accélère sa désactivation (Bildl et al., 2004). Puisque TRPC6 peut aussi être modulé par la CaM (Boulay, 2002), nous avons vérifié l'implication de la CK2 dans la régulation de l'entrée de calcium. Les essais fonctionnels de mesure de $[Ca^{2+}]_i$ en présence de DMAT ou de TBCA réfutent cette implication. De fait, un traitement avec des inhibiteurs spécifiques de la CK2 n'affecte pas l'entrée de calcium dans les cellules T6.11 ou A7r5. Par contre, l'inhibition de la CK2 affecte la première phase de mobilisation calcique, soit la relâche de calcium du RE. En effet, le DMAT et le TBCA amplifient la relâche calcique, les $[Ca^{2+}]_i$ atteignant presque les 800 nM, alors qu'en conditions contrôles, elles atteignent environ 650 nM. Cette différence n'est toutefois que temporaire, puisqu'au bout de quelques secondes, toutes les $[Ca^{2+}]_i$ reviennent au même niveau. Cette augmentation de la relâche nette est-elle suffisante pour augmenter l'activation des canaux SOC? Puisque TRPC6 est un canal ROC et non SOC, il n'est pas régulé par l'état des réserves calciques du RE. À cet effet, il a été démontré que l'expression de TRPC6 n'affecte pas l'entrée de calcium induite par la thapsigargine (Boulay et al., 1997). Nous concluons donc que

l'entrée de calcium médiée par TRPC6 n'est pas influencée par l'amplitude de la relâche, et que la CK2 n'affecte pas cette entrée.

CONCLUSION

Dans la présente étude, nous avons identifié deux sites de phosphorylation de TRPC6. La sérine 448 est phosphorylée par un mécanisme dépendant de la PKC, ce qui inhibe l'activité canal de TRPC6. Ceci constitue un mécanisme de rétroaction négative, les deux protéines étant activées par les mêmes voies de signalisation.

Nous ne pouvons affirmer pour l'instant que la PKC δ est l'isozyme responsable de la phosphorylation de la sérine 448 et de l'inhibition dépendante de la PKC de TRPC6 dans les cellules HEK293. Nous savons toutefois que la phosphorylation est effectuée par une isozyme non-classique des PKC. De plus, les résultats obtenus avec les cellules A7r5 démontrent que la PKC δ est responsable de l'inhibition de l'entrée de calcium induite par la vasopressine. Puisque cette entrée est démontrée comme étant majoritairement dépendante de TRPC6, nous supportons l'implication de la PKC δ dans la phosphorylation et la modulation de l'activité de TRPC6.

Nous avons aussi identifié la sérine 814 comme étant phosphorylée de façon basale dans les cellules HEK293T. Le rôle physiologique de cette phosphorylation n'a pas été élucidé, ni l'identité de la kinase impliquée. D'autres sites potentiels de phosphorylation basale sont à envisager si nous effectuons nos études de marquage métabolique en présence de facteurs de croissance. Il nous serait entre autres possible d'identifier la ou les tyrosines phosphorylées par Fyn, en se concentrant tout d'abord sur celles en N-terminal.

Étant donné l'implication de TRPC6 dans plusieurs pathologies, la compréhension des mécanismes de régulation de TRPC6 est un élément clé pour le développement d'éventuelles thérapies ciblant TRPC6. Le rôle de la phosphorylation de la Ser814 reste à éclaircir, mais en élucidant le mécanisme d'inhibition de TRPC6 par la PKC, nous pouvons prétendre que si nous réussissions à moduler la phosphorylation de la Ser448 de TRPC6, nous serions en mesure de contrôler l'activité de TRPC6, à l'origine de ces pathologies.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Pr Guylain Boulay, pour m'avoir permis d'effectuer mes études graduées dans son laboratoire. Je le remercie aussi pour sa disponibilité, sa patience, son soutien et la confiance qu'il a placée en moi et mes projets de recherche. Les innombrables discussions que nous avons eues ont autant contribué à ma formation que tous les cours que j'ai pu suivre.

Je remercie les Pr Jean-Bernard Denault, Xavier Roucou et Robert Moreau pour l'évaluation de ma thèse. Vos commentaires en ont augmenté la qualité.

J'aimerais aussi remercier tous les membres du laboratoire, présents et passés, qui ont agrémenté et facilité ces sept dernières années. Merci pour les coups de mains, pour les conseils, pour les discussions, parfois même scientifiques! En particulier, merci à Nancy Francoeur, Marc Lussier, Pascale Lepage, Sylvie Cayouette, Cynthia Bernier, Alexandre P. Blanchard, Maxime Paradis, Nathalie Nguyen, Francis Phaneuf, Valérie Chartrand, Michaël Monet et Youssef Guedri. Merci à tout le monde du laboratoire de Pr Gaétan Guillemette, particulièrement Guillaume, Yannik, Marc-Olivier, Éric, Ivana, Benoit et Annabelle, et aux filles du laboratoire de Pre Christine Lavoie.

Merci aux autres membres du département et de la faculté.

Merci à la bande de la brasserie et merci à ma famille, pour leur soutien et leur constante volonté à essayer de comprendre ce que je faisais toutes ces années (en vain!).

Finalement, et surtout, merci à Catherine pour sa foi en mes capacités, ses encouragements, pour son amour inconditionnel et pour Clara. Cette dernière année a été particulièrement étonnante!

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Adcock JJ** (2009) TRPV1 receptors in sensitisation of cough and pain reflexes. *Pulm Pharmacol Ther* 22(2): 65-70.
- Ahmed G, Mehta D, Vogel S, Holinstat M, Paria B, Tiruppathi C et Malik A** (2004) Protein kinase C phosphorylates the TRPC1 channel and regulates store-operated Ca^{2+} entry in endothelial cells. *J Biol Chem* 279(20): 20941-20949.
- Arguin G, Regimbald-Dumas Y, Fregeau M, Caron A et Guillemette G** (2007) Protein kinase C phosphorylates the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 and decreases the mobilization of Ca^{2+} in pancreatoma AR4-2J cells. *J Endocrinol* 192(3): 659-668.
- Beck B, Zholos A, Sydorenko V, Roudbaraki M, Lehen'kyi V, Bordat P, Prevarskaya N et Skryma R** (2006) TRPC7 is a receptor-operated DAG-activated channel in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 126(9): 1982-1993.
- Becker EBE, Olivera PL, Glitsch MD, Banks GT, Achilli F, Hardy A, Nolan PM, Fisher EMC et Davies KE** (2009) A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(16): 6706-6711.
- Bernier C** (2005) Élaboration et caractérisation d'un mutant dominant négatif de TRPC6. Mémoire de maîtrise. Département de pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé. Université de Sherbrooke.
- Berridge MJ** (1990) CALCIUM OSCILLATIONS. *J Biol Chem* 265(17): 9583-9586.
- Berridge MJ, Lipp P et Bootman MD** (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Bio* 1(1): 11-21.
- Bezzerides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A et Clapham DE** (2004) Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* 6(8): 709-720.
- Bildl W, Strassmaier T, Thurm H, Andersen J, Eble S, Oliver D, Knipper M, Mann M, Schulte U, Adelman J et Fakler B** (2004) Protein kinase CK2 is coassembled with small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and regulates channel gating. *Neuron* 43(6): 847-858.
- Bird GS et Putney JW** (1993) Inhibition of thapsigargin-induced calcium-entry by microinjected guanine-nucleotide analogs - evidence for the involvement of a small g-protein in capacitative calcium-entry. *J Biol Chem* 268(29): 21486-21488.
- Birnbaumer L, Zhu X, Jiang MS, Boulay G, Peyton M, Vannier B, Brown D, Platano D, Sadeghi H, Stefani E et Birnbaumer M** (1996) On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: Roles for Trp proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26): 15195-15202.

Blaustein M et Lederer W (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79(3): 763-854.

Boucher C et Sandford R (2004) Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD, MIM 173900, PKD1 and PKD2 genes, protein products known as polycystin-1 and polycystin-2). *Eur J Hum Genet* 12(5): 347-354.

Boulay G (2002) Ca^{2+} -calmodulin regulates receptor-operated Ca^{2+} entry activity of TRPC6 in HEK-293 cells. *Cell Calcium* 32(4): 201-207.

Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang MS, Dietrich A, Zhu MX, Chen ZG, Birnbaumer M, Mikoshiba K et Birnbaumer L (1999) Modulation of Ca^{2+} entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): Evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca^{2+} entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 14955-14960.

Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang MS, Hurst R, Stefani E et Birnbaumer L (1997) Cloning and expression of a novel Mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the G(q) class of G protein. *J Biol Chem* 272(47): 29672-29680.

Bousquet SM, Monet M et Boulay G (2010) Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition. *J Biol Chem* 285(52): 40534-43.

Bristow G, Lane T, Walker M, Chen L, Sei Y, Hyde T, Kleinman J, Harrison P et Eastwood S (2009) Expression of kinase interacting with stathmin (KIS, UHMK1) in human brain and lymphoblasts: Effects of schizophrenia and genotype. *Brain Res* 1301: 197-206.

Cahalan MD (2009) STIMulating store-operated Ca^{2+} entry. *Nat Cell Biol* 11(6): 669-677.

Cai R, Ding X, Zhou KC, Shi Y, Ge RL, Ren G, Jin YN et Wang YZ (2009) Blockade of TRPC6 channels induced G2/M phase arrest and suppressed growth in human gastric cancer cells. *Int J Cancer* 125(10): 2281-2287.

Cai Y, Anyatonwu G, Okuhara D, Lee K, Yu Z, Onoe T, Mei C, Qian Q, Geng L, Witzgall R, Ehrlich B et Somlo S (2004) Calcium dependence of polycystin-2 channel activity is modulated by phosphorylation at Ser812. *J Biol Chem* 279(19): 19987-19995.

Caron A, Chaloux B, Arguin G et Guillemette G (2007) Protein kinase C decreases the apparent affinity of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 in RINm5F cells. *Cell Calcium* 42(3): 323-331.

Cayouette S, Bousquet SM, Francoeur N, Dupré E, Monet M, Gagnon H, Guedri YB, Lavoie C et Boulay G (2010) Involvement of Rab9 and Rab11 in the intracellular trafficking of TRPC6. *Biochim Biophys Acta* 1803(7): 805-812.

- Cayouette S, Lussier MP, Mathieu EL, Bousquet SM et Boulay G** (2004) Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon G(q) protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* 279(8): 7241-7246.
- Chen Y, Zhang Z, Lv X, Wang Y, Hu Z, Sun H, Tan R, Liu Y, Bian G, Xiao Y, Li Q, Yang Q, Ai J, Feng L, Yang Y, Wei Y et Zhou Q** (2008) Expression of Pkd2l2 in testis is implicated in spermatogenesis. *Biol Pharm Bull* 31(8): 1496-1500.
- Cheng X, Shen D, Samie M et Xu H** (2010) Mucolipins: Intracellular TRPML1-3 channels. *FEBS Lett* 584(10): 2013-2021.
- Chigurupati S, Venkataraman R, Barrera D, Naganathan A, Madan M, Paul L, Pattisapu J, Kyriazis G, Sugaya K, Bushnev S, Lathia J, Rich J et Chan S** (2010) Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res* 70(1): 418-427.
- Choveau F, Rodriguez N, Abderemane Ali F, Labro A, Rose T, Dahimene S, Boudin H, Le Henaff C, Escande D, Snyders D, Charpentier F, Merot J, Baro I et Loussouarn G** (2010) KCNQ1 channels voltage dependency through a voltage-dependent binding of the S4-S5 linker to the pore domain. *J Biol Chem*. Sous presse.
- Chung H, Huang Y, Lau L et Huganir R** (2004) Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* 24(45): 10248-10259.
- Cosens D et Manning A** (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224(5216): 285-287.
- Delaney J et Mlodzik M** (2006) TGF-beta activated kinase-1: new insights into the diverse roles of TAK1 in development and immunity. *Cell Cycle* 5(24): 2852-2855.
- Deshpande D, Pascual R, Wang S, Eckman D, Riemer E, Funk C et Penn R** (2007) PKC-dependent regulation of the receptor locus dominates functional consequences of cysteinyl leukotriene type 1 receptor activation. *FASEB J* 21(10): 2335-2342.
- Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Emmel J, Kalwa H, Hofmann T et Gudermann T** (2003) N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem* 278(48): 47842-47852.
- Dietrich A, Schnitzler MMY, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaya G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T et Birnbaumer L** (2005a) Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6(-/-) mice. *Mol Cell Biol* 25(16): 6980-6989.
- Dietrich A, Schnitzler MMY, Kalwa H, Storch U et Gudermann T** (2005b) Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *N-S Arch Pharmacol* 371(4): 257-265.
- Ding X, He Z, Shi Y, Wang Q et Wang Y** (2010) Targeting TRPC6 channels in oesophageal carcinoma growth. *Expert Opin Ther Targets* 14(5): 513-527.

- El Boustany C, Bidaux G, Enfissi A, Delcourt P, Prevarskaya N et Capiod T (2008).** Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology* 47(6): 2068-2077.
- Fasolato C, Hoth M et Penner R (1993)** A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J Biol Chem* 268(28): 20737-20740.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M et Rao A (2006)** A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441(7090): 179-185.
- Fujii K, Zhu G, Liu Y, Hallam J, Chen L, Herrero J et Shaw S (2004)** Kinase peptide specificity: improved determination and relevance to protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(38): 13744-13749.
- García-Añoveros J et Nagata K (2007)** TRPA1. *Handb Exp Pharmacol* (179): 347-362.
- Ge R, Tai Y, Sun Y, Zhou K, Yang S, Cheng T, Zou Q, Shen F et Wang Y (2009)** Critical role of TRPC6 channels in VEGF-mediated angiogenesis. *Cancer Lett* 283(1): 43-51.
- Gottipati S, Rao N et Fung-Leung W (2008)** IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity. *Cell Signal* 20(2): 269-276.
- Guerra B, Boldyreff B, Sarno S, Cesaro L, Issinger O et Pinna L (1999)** CK2: a protein kinase in need of control. *Pharmacol Ther* 82(2-3): 303-313.
- Hamdollah Zadeh M, Glass C, Magnussen A, Hancox J et Bates D (2008)** VEGF-mediated elevated intracellular calcium and angiogenesis in human microvascular endothelial cells in vitro are inhibited by dominant negative TRPC6. *Microcirculation* 15(7): 605-614.
- Hardie RC et Minke B (1992)** The TRP gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in drosophila photoreceptors. *Neuron* 8(4): 643-651.
- Hassock S, Zhu M, Trost C, Flockerzi V et Authi K (2002)** Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood* 100(8): 2801-2811.
- Hisatsune C, Kuroda Y, Nakamura K, Inoue T, Nakamura T, Michikawa T, Mizutani A et Mikoshiba K (2004)** Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 279(18): 18887-18894.
- Hochstrate P (1989)** Lanthanum mimics the trp photoreceptor mutant of drosophila in the blowfly calliphora. *J Comp Physiol A* 166(2): 179-187.
- Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T et Schultz G (1999)** Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397(6716): 259-263.

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G et Gudermann T (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(11): 7461-7466.

Hosey M, Benovic J, DeBurman S et Richardson R (1995) Multiple mechanisms involving protein phosphorylation are linked to desensitization of muscarinic receptors. *Life Sci* 56(11-12): 951-955.

Irvine RF (1990) Quantal Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates; a possible mechanism. *Febs Letters* 263(1): 5-9.

Jho D, Mehta D, Ahmmed G, Gao X, Tiruppathi C, Broman M et Malik A (2005) Angiopoietin-1 opposes VEGF-induced increase in endothelial permeability by inhibiting TRPC1-dependent Ca^{2+} influx. *Circ Res* 96(12): 1282-1290.

Jung S, Strotmann R, Schultz N et Plant TD (2002) TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol - Cell Ph* 282(2): C347-C359.

Kernan M (2007) Mechanotransduction and auditory transduction in *Drosophila*. *Pflugers Arch* 454(5): 703-720.

Kim JY et Saffen D (2005) Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *J Biol Chem* 280(36): 32035-32047.

Kinoshita H, Kuwahara K, Nishida M, Jiang Z, Rong X, Kiyonaka S, Kuwabara Y, Kurose H, Inoue R, Mori Y, Li Y, Nakagawa Y, Usami S, Fujiwara M, Yamada Y, Minami T, Ueshima K et Nakao K (2010) Inhibition of TRPC6 Channel Activity Contributes to the Antihypertrophic Effects of Natriuretic Peptides-Guanylyl Cyclase-A. Signaling in the Heart. *Circ Res*. Sous presse.

Kiselyov K, Mignery G, Zhu M et Muallem S (1999) The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* 4(3): 423-429.

Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L et Muallem S (1998) Functional interaction between InsP(3) receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396(6710): 478-482.

Kobori T, Smith GD, Sandford R et Edwardson JM (2009) The transient receptor potential channels TRPP2 and TRPC1 form a heterotetramer with a 2:2 stoichiometry and an alternating subunit arrangement. *J Biol Chem* 284(51): 35507-35513.

Koitabashi N, Aiba T, Hesketh G, Rowell J, Zhang M, Takimoto E, Tomaselli G et Kass D (2010) Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 48(4): 713-724.

Köttgen M, Benzing T, Simmen T, Tauber R, Buchholz B, Feliciangeli S, Huber T, Schermer B, Kramer-Zucker A, Höpker K, Simmen K, Tschucke C, Sandford R, Kim E, Thomas G et Walz G (2005) Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J* 24(4): 705-716.

- Kraft R et Harteneck C** (2005) The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch* 451(1): 204-211.
- Kunichika N, Landsberg JW, Yu Y, Kunichika H, Thistlethwaite PA, Rubin LJ et Yuan JXJ** (2004) Bosentan inhibits transient receptor potential channel expression in pulmonary vascular myocytes. *Am J Resp Crit Care* 170(10): 1101-1107.
- Kwan H, Huang Y et Yao X** (2006) Protein kinase C can inhibit TRPC3 channels indirectly via stimulating protein kinase G. *J Cell Physiol* 207(2): 315-321.
- Kwan HY, Huang Y et Yao XQ** (2004) Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8): 2625-2630.
- Labro A, Raes A, Grottesi A, Van Hoorick D, Sansom M et Snyders D** (2008) Kv channel gating requires a compatible S4-S5 linker and bottom part of S6, constrained by non-interacting residues. *J Gen Physiol* 132(6): 667-680.
- Langenickel T, Olive M, Boehm M, San H, Crook M et Nabel E** (2008) KIS protects against adverse vascular remodeling by opposing stathmin-mediated VSMC migration in mice. *J Clin Invest* 118(12): 3848-3859.
- Lee HC** (2001) Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 317-345.
- Lee HC** (1997) Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev* 77(4): 1133-1164.
- Lee KP, Yuan JP, Hong JH, So I, Worley PF et Muallem S** (2010) An endoplasmic reticulum/plasma membrane junction: STIM1/Orai1/TRPCs. *FEBS Lett* 584(10): 2022-2027.
- Leitges M, Gimborn K, Elis W, Kalesnikoff J, Hughes M, Krystal G et Huber M** (2002) Protein kinase C-delta is a negative regulator of antigen-induced mast cell degranulation. *Mol Cell Biol* 22(12): 3970-3980.
- Li J, Zhao L, Ferries IK, Jiang L, Desta MZ, Yu X, Yang Z, Duncan RL et Turner CH** (2010) Skeletal phenotype of mice with a null mutation in Cav 1.3 L-type calcium channel. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 10(2): 180-187.
- Li M, West J, Numann R, Murphy B, Scheuer T et Catterall W** (1993) Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* 261(5127): 1439-1442.
- Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, Flockerzi V, Zhu MX, Armstrong DL et Birnbaumer L** (2008) Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(8): 2895-2900.
- Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL et Birnbaumer L** (2007) Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(11): 4682-4687.

- Liao Y, Plummer N, George M, Abramowitz J, Zhu M et Birnbaumer L** (2009) A role for Orai in TRPC-mediated Ca^{2+} entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca^{2+} entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9): 3202-3206.
- Liman E, Corey D et Dulac C** (1999) TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10): 5791-5796.
- Lin MJ, Leung GPH, Zhang WM, Yang XR, Yip KP, Tse CM et Sham JSK** (2004) Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca^{2+} channels in pulmonary arterial smooth muscle cells - A novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 95(5): 496-505.
- Lintschinger B, Balzer-Geldsetzer M, Baskaran T, Graier WF, Romanin C, Zhu MX et Groschner K** (2000) Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca^{2+} -sensitive cation channels. *J Biol Chem* 275(36): 27799-27805.
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE et Meyer T** (2005) STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Current Biology* 15(13): 1235-1241.
- Liu XB, Bandyopadhyay BC, Singh BB, Groschner K et Ambudkar IS** (2005) Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. *J Biol Chem* 280(22): 21600-21606.
- Lockwich T, Singh B, Liu X et Ambudkar I** (2001) Stabilization of cortical actin induces internalization of transient receptor potential 3 (Trp3)-associated caveolar Ca^{2+} signaling complex and loss of Ca^{2+} influx without disruption of Trp3-inositol trisphosphate receptor association. *J Biol Chem* 276(45): 42401-42408.
- Lockwich TP, Liu XB, Singh BB, Jadlowiec J, Weiland S et Ambudkar IS** (2000) Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J Biol Chem* 275(16): 11934-11942.
- Long SB, Campbell EB et MacKinnon R** (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K^{+} channel. *Science* 309(5736): 897-903.
- Lu WJ, Ran PX, Zhang DD, Peng GY, Li B, Zhong NS et Wang J** (2010) Sildenafil inhibits chronically hypoxic upregulation of canonical transient receptor potential expression in rat pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol - Cell Ph* 298(1): C114-C123.
- Mani B, Brueggemann L, Cribbs L et Byron K** (2009) Opposite regulation of KCNQ5 and TRPC6 channels contributes to vasopressin-stimulated calcium spiking responses in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Cell Calcium* 45(4): 400-411.
- Martiny-Baron G, Kazanietz M, Mischak H, Blumberg P, Kochs G, Hug H, Marmé D et Schächtele C** (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *J Biol Chem* 268(13): 9194-9197.
- Meggio F, Marin O et Pinna L** (1994) Substrate specificity of protein kinase CK2. *Cell Mol Biol Res* 40(5-6): 401-409.

Mellor H et Parker P (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 332 (Pt 2): 281-292.

Minke B et Selinger Z (1996) The roles of trp and calcium in regulating photoreceptor function in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* 6(4): 459-466.

Mio K, Ogura T, Hara Y, Mori Y et Sato C (2005) The non-selective cation-permeable channel TRPC3 is a tetrahedron with a cap on the large cytoplasmic end. *Biochem Biophys Res Commun* 333(3): 768-777.

Miyagi K, Kiyonaka S, Yamada K, Miki T, Mori E, Kato K, Numata T, Sawaguchi Y, Numaga T, Kimura T, Kanai Y, Kawano M, Wakamori M, Nomura H, Koni I, Yamagishi M et Mori Y (2009) A pathogenic C terminus-truncated polycystin-2 mutant enhances receptor-activated Ca^{2+} entry via association with TRPC3 and TRPC7. *J Biol Chem* 284(49): 34400-34412.

Möller C, Wei C, Altintas M, Li J, Greka A, Ohse T, Pippin J, Rastaldi M, Wawersik S, Schiavi S, Henger A, Kretzler M, Shankland S et Reiser J (2007) Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18(1): 29-36.

Montell C et Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *drosophila* trp locus - a putative integral membrane-protein required for phototransduction. *Neuron* 2(4): 1313-1323.

Mukerji N, Damodaran T et Winn M (2007) TRPC6 and FSGS: the latest TRP channelopathy. *Biochim Biophys Acta* 1772(8): 859-868.

Nilius B et Voets T (2005) TRP channels: a TR(1)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch* 451(1): 1-10.

Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima N, Ide T, Inoue R et Kurose H (2010) Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *J Biol Chem*. Sous presse.

Nishikawa K, Toker A, Johannes F, Songyang Z et Cantley L (1997) Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem* 272(2): 952-960.

Odell AF, Scott JL et Van Helden DF (2005) Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation, membrane insertion, and activation of transient receptor potential channel 4. *J Biol Chem* 280(45): 37974-37987.

Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kurosaki T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K et Mori Y (1999) Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7 - Ca^{2+} -permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 274(39): 27359-27370.

Parekh AB et Putney JW (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85(2): 757-810.

- Park K, Yang J, Seikel E et Trimmer J** (2008) Potassium channel phosphorylation in excitable cells: providing dynamic functional variability to a diverse family of ion channels. *Physiology (Bethesda)* 23: 49-57.
- Patterson RL, van Rossum DB et Gill DL** (1999) Store-operated Ca^{2+} entry: Evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* 98(4): 487-499.
- Peng H, Lewandrowski U, Müller B, Sickmann A, Walz G et Wegierski T** (2010) Identification of a Protein Kinase C-dependent phosphorylation site involved in sensitization of TRPV4 channel. *Biochem Biophys Res Commun* 391(4): 1721-1725.
- Phillips AM, Bull A et Kelly LE** (1992) Identification of a drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron* 8(4): 631-642.
- Popescu D, Ham A et Shieh B** (2006) Scaffolding protein INAD regulates deactivation of vision by promoting phosphorylation of transient receptor potential by eye protein kinase C in *Drosophila*. *J Neurosci* 26(33): 8570-8577.
- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P et Meldolesi J** (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74(3): 595-636.
- Putney JW** (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7(1): 1-12.
- Ramsey IS, Delling M et Clapham DE** (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68: 619-647.
- Randriamampita C et Tsien RY** (1993) Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* 364(6440): 809-814.
- Redondo P, Harper A, Salido G, Pariente J, Sage S et Rosado J** (2004) A role for SNAP-25 but not VAMPs in store-mediated Ca^{2+} entry in human platelets. *J Physiol* 558(Pt 1): 99-109.
- Reiser J, Polu KR, Moller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei CL, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE et Pollak MR** (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nature Genetics* 37(7): 739-744.
- Roos J, DiGregorio P, Yeromin A, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak J, Wagner S, Cahalan M, Velichelebi G et Stauderman K** (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J Cell Biol* 169(3): 435-445.
- Saleh S, Albert A et Large W** (2009a) Obligatory role for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in activation of native TRPC1 store-operated channels in vascular myocytes. *J Physiol* 587(Pt 3): 531-540.
- Saleh S, Albert A et Large W** (2009b) Activation of native TRPC1/C5/C6 channels by endothelin-1 is mediated by both PIP(3) and PIP(2) in rabbit coronary artery myocytes. *J Physiol* 587(Pt 22): 5361-5375.

Saleh S, Albert A, Peppiatt C et Large W (2006) Angiotensin II activates two cation, conductances with distinct TRPC1 and TRPC6 channel properties in rabbit mesenteric artery myocytes. *J Physiol* 577(Pt 2): 479-495.

Sanchez-Miranda E, Ibarra-Sanchez A et Gonzalez-Espinosa C (2010) Fyn kinase controls FcepsilonRI receptor-operated calcium entry necessary for full degranulation in mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 391(4): 1714-1720.

Sarker R, Grønborg M, Cha B, Mohan S, Chen Y, Pandey A, Litchfield D, Donowitz M et Li X (2008) Casein kinase 2 binds to the C terminus of Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3) and stimulates NHE3 basal activity by phosphorylating a separate site in NHE3. *Mol Biol Cell* 19(9): 3859-3870.

Scholle A, Zimmer T, Koopmann R, Engeland B, Pongs O et Benndorf K (2004) Effects of Kv1.2 intracellular regions on activation of Kv2.1 channels. *Biophys J* 87(2): 873-882.

Sel S, Rost B, Yildirim A, Sel B, Kalwa H, Fehrenbach H, Renz H, Gudermann T et Dietrich A (2008) Loss of classical transient receptor potential 6 channel reduces allergic airway response. *Clin Exp Allergy* 38(9): 1548-1558.

Shao Y, Czymmek KJ, Jones PA, Fomin VP, Akanbi K, Duncan RL et Farach-Carson MC (2009) Dynamic interactions between L-type voltage-sensitive calcium channel Cav1.2 subunits and ahnak in osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 296(5): C1067-1078.

Shi J, Mori E, Mori Y, Mori M, Li J, Ito Y et Inoue R (2004) Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J Physiol-London* 561(2): 415-432.

Singh B, Liu X, Tang J, Zhu M et Ambudkar I (2002) Calmodulin regulates Ca²⁺-dependent feedback inhibition of store-operated Ca²⁺ influx by interaction with a site in the C terminus of TrpC1. *Mol Cell* 9(4): 739-750.

Singh BB, Lockwich TP, Bandyopadhyay BC, Liu XB, Bollimuntha S, Brazer SC, Combs C, Das S, Leenders AGM, Sheng ZH, Knepper MA, Ambudkar SV et Ambudkar IS (2004) VAMP2-dependent exocytosis regulates plasma membrane insertion of TRPC3 channels and contributes to agonist-stimulated Ca²⁺ influx. *Mol Cell* 15(4): 635-646.

Smani T, Zakharov S, Csutora P, Leno E, Trepakova E et Bolotina V (2004) A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol* 6(2): 113-120.

Smyth JT, Lemonnier L, Vazquez G, Bird GS et Putney JW (2006) Dissociation of regulated trafficking of TRPC3 channels to the plasma membrane from their activation by phospholipase C. *J Biol Chem* 281(17): 11712-11720.

Snetkov V, Thomas G, Teague B, Leach R, Shaifta Y, Knock G, Aaronson P et Ward J (2008) Low concentrations of sphingosylphosphorylcholine enhance pulmonary artery vasoreactivity: the role of protein kinase C delta and Ca²⁺ entry. *Hypertension* 51(2): 239-245.

Soboloff J, Spassova M, Tang X, Hewavitharana T, Xu W et Gill D (2006) Orail and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 281(30): 20661-20665.

Soboloff J, Spassova M, Xu W, He LP, Cuesta N et Gill DL (2005) Role of endogenous TRPC6 channels in Ca^{2+} signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 280(48): 39786-39794.

Spassova M, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J et Gill D (2006a) A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44): 16586-16591.

Spassova M, Soboloff J, He L, Xu W, Dziadek M et Gill D (2006b) STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(11): 4040-4045.

Steinberg S (2004) Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem J* 384(Pt 3): 449-459.

Susstoby E, Selinger Z et Minke B (1991) Lanthanum reduces the excitation efficiency in fly photoreceptors. *J Gen Physiol* 98(4): 849-868.

Suzuki Y, Inoue T et Ra C (2010) L-type Ca^{2+} channels: a new player in the regulation of Ca^{2+} signaling, cell activation and cell survival in immune cells. *Mol Immunol* 47(4): 640-648.

Takahashi S, Lin H, Geshi N, Mori Y, Kawarabayashi Y, Takami N, Mori M, Honda A et Inoue R (2008) Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. *J Physiol* 586(Pt 17): 4209-4223.

Tang J, Lin YK, Zhang ZM, Tikunova S, Birnbaumer L et Zhu MX (2001) Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of Trp channels. *J Biol Chem* 276(24): 21303-21310.

Trebak M, Hempel N, Wedel BJ, Smyth JT, Bird GS et Putney JW (2005) Negative regulation of TRPC3 channels by protein kinase C-mediated phosphorylation of serine 712. *Mol Pharmacol* 67(2): 558-563.

Trebak M, Vazquez G, Bird GSJ et Putney JW (2003) The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium* 33(5-6): 451-461.

Trepakova E, Csutora P, Hunton D, Marchase R, Cohen R et Bolotina V (2000) Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275(34): 26158-26163.

Vaca L, Sinkins W, Hu Y, Kunze D et Schilling W (1994) Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am J Physiol* 267(5 Pt 1): C1501-1505.

Vazquez G, Bird G, Mori Y et Putney JJ (2006) Native TRPC7 channel activation by an inositol trisphosphate receptor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281(35): 25250-25258.

Vazquez G, Lievreumont J, St J Bird G et Putney JJ (2001) Human Trp3 forms both inositol trisphosphate receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT40 avian B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20): 11777-11782.

Vazquez G, Wedel BJ, Kawasaki BT, Bird GS et Putney JW (2004) Obligatory role of Src kinase in the signaling mechanism for TRPC3 cation channels. *J Biol Chem* 279(39): 40521-40528.

Venkatachalam K, Ma H, Ford D et Gill D (2001) Expression of functional receptor-coupled TRPC3 channels in DT40 triple receptor InsP3 knockout cells. *J Biol Chem* 276(36): 33980-33985.

Venkatachalam K, van Rossum D, Patterson R, Ma H et Gill D (2002) The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol* 4(11): E263-272.

Venkatachalam K, Zheng F et Gill D (2003) Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* 278(31): 29031-29040.

Vennekens R, Voets T, Bindels R, Droogmans G et Nilius B (2002) Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium* 31(6): 253-264.

Vig M, Beck A, Billingsley JM, Lis A, Parvez S, Peinelt C, Koomoa DL, Soboloff J, Gill DL, Fleig A, Kinet JP et Penner R (2006a) CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* 16(20): 2073-2079.

Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R et Kinet JP (2006b) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* 312(5777): 1220-1223.

Voolstra O, Beck K, Oberegelsbacher C, Pfannstiel J et Huber A (2010) Light-dependent phosphorylation of the drosophila transient receptor potential ion channel. *J Biol Chem* 285(19): 14275-14284.

Vriens J, Appendino G et Nilius B (2009) Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* 75(6): 1262-1279.

Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Schnitzler MMY, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F et Gudermann T (2006) Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(50): 19093-19098.

Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT et Brayden JE (2002) Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res* 90(3): 248-250.

Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G et Montell C (1995) TRPC1, a human homolog of a drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(21): 9652-9656.

Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howel

- DN, Vance JM et Rosenberg PB** (2005) A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308(5729): 1801-1804.
- Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L et Yao X** (2008) GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 7(9): 1598-1608.
- Yao Y, Ferrer-Montiel AV, Montal M et Tsien RY** (1999) Activation of store-operated Ca^{2+} current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* 98(4): 475-485.
- Yeromin AV, Zhang SYL, Jiang WH, Yu Y, Safrina O et Cahalan MD** (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 443(7108): 226-229.
- Yu Y, Fantozzi L, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ et Yuan JXJ** (2004) Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(38): 13861-13866.
- Yu Y, Keller S, Remillard C, Safrina O, Nicholson A, Zhang S, Jiang W, Vangala N, Landsberg J, Wang J, Thistlethwaite P, Channick R, Robbins I, Loyd J, Ghofrani H, Grimminger F, Schermuly R, Cahalan M, Rubin L et Yuan J** (2009) A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119(17): 2313-2322.
- Yuan JP, Zeng WZ, Huang GN, Worley PF et Muallem S** (2007) STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* 9(6): 636-U638.
- Yuan S, Sunahara F et Sen A** (1987) Tumor-promoting phorbol esters inhibit cardiac functions and induce redistribution of protein kinase C in perfused beating rat heart. *Circ Res* 61(3): 372-378.
- Zhang L, Guo F, Kim J et Saffen D** (2006) Muscarinic acetylcholine receptors activate TRPC6 channels in PC12D cells via Ca^{2+} store-independent mechanisms. *J Biochem* 139(3): 459-470.
- Zhang S, Yu Y, Roos J, Kozak J, Deerinck T, Ellisman M, Stauderman K et Cahalan M** (2005) STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* 437(7060): 902-905.
- Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XHF, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA et Cahalan MD** (2006) Genome-wide RNAi screen of Ca^{2+} influx identifies genes that regulate Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(24): 9357-9362.
- Zhang Z, Tang J, Tikunova S, Johnson J, Chen Z, Qin N, Dietrich A, Stefani E, Birnbaumer L et Zhu M** (2001) Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3168-3173.

Zhu M, Chae M, Kim H, Lee Y, Kim M, Jin N, Yang D, So I et Kim K (2005)
Desensitization of canonical transient receptor potential channel 5 by protein kinase C.
Am J Physiol Cell Physiol 289(3): C591-600.